

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN DE LA CARRERA DE INGENIERÍA EN
BIOTECNOLOGÍA DEL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA**

**CONTROL MICROBIANO DE *Ceratitis capitata* (Wiedmann) (MOSCA DEL
MEDITERRÁNEO) CON EL HONGO ENTOMOPATÓGENO
Beauveria bassiana (Balsamo) Vuillemin.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGÍA Y ZOOLOGÍA AGRÍCOLA
IMYZA, INTA-CASTELAR**

Luis Alonso Porras Reyes

BUENOS AIRES, ARGENTINA

2007

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN DE LA CARRERA DE INGENIERÍA EN
BIOTECNOLOGÍA DEL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA**

**CONTROL MICROBIANO DE *Ceratitis capitata* (Wiedmann) (MOSCA DEL
MEDITERRÁNEO) CON EL HONGO ENTOMOPATÓGENO
Beauveria bassiana (Balsamo) Vuillemin.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGÍA Y ZOOLOGÍA AGRÍCOLA
IMYZA, INTA-CASTELAR**

Luis Alonso Porras Reyes

BUENOS AIRES, ARGENTINA

2007

**Control Microbiano de *Ceratitis capitata* (Wiedmann) (Diptera: Tephritidae)
(Mosca del Mediterráneo) con el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana***

Luis Alonso Porras Reyes*

Resumen

Ceratitis capitata (Wied.) "mosca de la fruta o del Mediterráneo" constituye, junto con algunos otros miembros de la familia Tephritidae, el grupo de dípteros fitófagos con mayor impacto económico en el mundo. Por tanto, se hace necesario buscar nuevas alternativas de control. El objetivo de este trabajo es seleccionar cepas promisorias de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Viull. bajo condiciones de laboratorio en favor del control de la MM. Para ello, se hicieron una serie de ensayos empleando el estado adulto como etapa vulnerable al ataque del hongo entomopatógeno. Se llevó a cabo una primera etapa de selección empleando una concentración de 5×10^9 CV/m². Además, se determinó la CL₉₀, Sobrevivencia Media (SM), compatibilidad con insecticidas y ensayos de producción. Los insecticidas Mercaptotion 100% CE (Lupara®) y Dimetoato 40% CE (Sistémico Icona) fueron evaluados para observar su grado de compatibilidad con las cepas seleccionadas. Se cuantificó la viabilidad en placas de Petri pos-tratamiento a diferentes concentraciones de insecticida (50, 100 y 200%). A partir de siete cepas evaluadas (mortalidad entre el 97,3-14%) se seleccionaron cuatro de ellas: Bb 26, Bb 259, Bb 132 y Bb 238. Los valores de CL₉₀ obtenidos se encuentran entre $1,1 \times 10^9$ CV/m² - $3,8 \times 10^{11}$ CV/m² (Bb 238 y Bb 26 respectivamente). La SM de las cepas varió entre 7-12 días (Bb 238 y Bb 26). Los mayores resultados de producción estuvieron en $6,97 \times 10^9$ UFC/mg y 20,67 g conidios/kg arroz (Bb 26 en ambos). Todas las cepas fueron compatibles con Mercaptotion. La Bb 132 presentó la mayor compatibilidad con el Dimetoato. En conclusión, los ensayos en el laboratorio permitieron seleccionar cepas con potencial para posteriores ensayos en condiciones naturales y para el desarrollo de micoinsecticidas.

Palabras claves: Control microbiano, hongo entomopatógeno, *Beauveria bassiana*, *Ceratitis capitata*, Dimetoato, Mercaptotion.

* INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2007.

Biological Control of *Ceratitis capitata* (Wiedmann) (Mediterranean Fly) with the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.)Vuill.

Luis Alonso Porras Reyes*

Abstract

Ceratitis capitata (Wied.) "Mediterranean fly" is considered, among other members of the Tephritidae family, one of the most impacting pests (economical terms) in the world. Therefore, there is a need for new control alternatives, besides the existing ones. The goal for this work is to select promisory isolates of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Viull. under laboratory conditions for the control of the MM. Several bioassays were tested using the adult as the vulnerable stage for the entomopathogenic fungus infection. The first part, an isolate *screening*, was done using a concentration of 5×10^9 VC/m². Besides, the LC₉₀, LT₅₀, insecticides compatibility and production assays were tested. Insecticides Mercaptotion 100% CE (Lupara®) and Dimetoato 40% CE (Sistémico Icona) were evaluated to see the compatibility with the selected isolates. This was done by quantification of the conidia's viability in Petri dishes after treatments to different concentrations of insecticides (50, 100 and 200%). From seven isolates evaluated (mortality ranged between 97,3-14%), four of them were selected: Bb 26, Bb 259, Bb 132 and Bb 238. CL₉₀ values ranged between 1×10^9 VC/m² - $3,8 \times 10^{11}$ VC/m² (Bb 238 and Bb 26 respectively). The LT₅₀ of the isolates ranged between 7-12 days (Bb 238 and Bb 26). The highest yields in production were $6,97 \times 10^9$ CFU/mg and 20,67g conidia/kg rice (In both cases Bb 26). All isolates were compatible to Mercaptotion. Bb 132 was the most compatible isolate to Dimetoato. In conclusion, laboratory assays allowed the selection of potencial isolates for later tests at natural conditions and for the development of mycoinsecticides.

Key words: Biological Control, entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, *Ceratitis capitata*, Dimetoato, Mercaptotion.

* INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2007.

ACREDITACION

CONTROL MICROBIANO DE *Ceratitis capitata* (Wiedmann) (MOSCA DEL MEDITERRÁNEO) CON EL HONGO ENTOMOPATÓGENO *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.

**Informe presentado a la Escuela de Biología del
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.**

Miembros del Tribunal

**MSc. Geovanni Garro Monge
Profesor Asesor- ITCR**

**Dr. Roberto Eduardo Lecuona
Asesor- Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola**

**MSc. Vladimir Villalba
Lector**

DEDICATORIA

A la memoria de Carlos M. Reyes Matamoros.

Luis Alonso Porras Reyes

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Olga y Marco, por su apoyo incondicional en estos años de estudio universitario, por respetar, creer y comprender las decisiones tomadas en mi vida. Les estaré siempre agradecido.

A la Comisión de Incentivos del Ministerio de Ciencia y Tecnología (MICIT) y al Consejo Nacional para Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) por su ayuda financiera en el desarrollo de este trabajo.

A la Vicerrectoría de Vida Estudiantil y Servicios Académicos del Instituto Tecnológico de Costa Rica (VIESA-TEC) por su ayuda económica para llevar a cabo la Práctica de Especialidad en el exterior.

A Roberto Eduardo Lecuona, por abrirme las puertas para llevar a cabo una gran experiencia en el Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA) INTA-Castelar; por su guía, atención, colaboración y apoyo en el desarrollo de este trabajo.

A Giovanni Garro, por su orientación y consejos durante la realización de mi trabajo final de graduación.

A Vladimir Villalba por colaborar como lector de este trabajo.

A Roberto Valverde, del Centro de Investigaciones Agronómicas de la UCR, por el apoyo y respaldo brindado para llevar a cabo este trabajo en el exterior.

A Julieta Posadas, Ignacio Mini, Cristina González y Teresa Miskow, por hacer de esta experiencia algo todavía más agradable, por la guía, aclaración de dudas, cariño, apoyo, sonrisas, y por los momentos agradables en el Laboratorio de Hongos Entomopatógenos.

A Ricardo Comerio, por sus consejos durante la ejecución de este trabajo. Además, por las buenas pláticas y su disposición a siempre ayudar en lo que necesitara.

A Rubén La Rosa, por su guía en el análisis estadístico de los resultados obtenidos en este trabajo, además de su ayuda en la corrección de este trabajo.

A mis amigos y amigas, que a la distancia mostraron su interés y preocupación por siempre apoyarme.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	4
ACREDITACIÓN.....	5
DEDICATORIA.....	6
AGRADECIMIENTOS.....	7
INDICE GENERAL.....	9
INDICE DE TABLAS.....	12
INDICE DE FIGURAS.....	13
INDICE DE ANEXOS.....	14
INTRODUCCIÓN.....	15
REVISIÓN DE LITERATURA.....	18
Familia Tephritidae.....	18
Descripción de la plaga.....	18
Ciclo de vida.....	20
Rango de hospederos.....	22
Métodos para el control de la plaga.....	23
Control Legal (Medidas Cuarentenarias).....	24
Detección y monitoreo de la plaga.....	24
Control Mecánico-Cultural.....	27
Control Químico.....	27
Control Genético.....	29

Control Biológico.....	32
Generalidades de los hongos entomopatógenos.....	35
Género <i>Beauveria</i> sp. y <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vuillemin.....	36
Etapas infectivas de los hongos entomopatógenos.....	38
<i>Adhesión</i>	38
<i>Germinación</i>	39
<i>Penetración</i>	40
<i>Multiplicación del hongo dentro del hospedero</i>	41
<i>Producción de toxinas</i>	42
<i>Muerte del insecto</i>	43
<i>Colonización</i>	43
<i>Salida del hongo hacia el exterior</i>	43
<i>Esporulación</i>	44
<i>Diseminación</i>	44
Uso de hongos como micoinsecticidas.....	45
OBJETIVOS.....	47
MATERIALES Y MÉTODOS.....	48
Selección de cepas.....	48
Ensayos de Concentración Letal Noventa (CL90) y Sobrevivencia Media (SM).....	51
Ensayos de compatibilidad con insecticidas.....	53
Determinación de la producción de cepas seleccionadas.....	54
Análisis Estadístico.....	56
RESULTADOS.....	57

Selección de cepas.....	57
Ensayos de Concentración Letal Noventa (CL90) y Supervivencia Media (SM).....	57
Ensayos de compatibilidad con insecticida.....	58
Determinación de la producción de cepas seleccionadas.....	60
DISCUSIÓN.....	61
CONCLUSIONES.....	65
RECOMENDACIONES.....	66
BIBLIOGRAFÍA.....	67
ANEXOS.....	77

ÍNDICE DE TABLAS

INDICE DE TABLAS

Núm.	Título	Pág.
1	Trampas utilizadas para la detección y monitoreo de Mosca del Mediterráneo	26
2	Principales toxinas producidas por hongos entomopatógenos	42
3	Porcentajes de mortalidad de adultos de <i>Ceratitis capitata</i> obtenidos en la selección de cepas	57
4	Concentración Letal Noventa (CL ₉₀) y Sobrevivencia Media (SM) de las cepas Bb 132, Bb 259, Bb 238 y Bb 26 en adultos de <i>Ceratitis capitata</i>	58
5	Cantidad de UFC/ml en 4 cepas de <i>B. bassiana</i> a diferentes concentraciones de insecticida (organofosforados)	58
6	Datos asociados a la producción en bolsas de arroz de las cepas seleccionadas	60

ÍNDICE DE FIGURAS

INDICE DE FIGURAS

Núm.	Título	Pág.
1	Etapas del ciclo de vida de la Mosca del Mediterráneo	22
2	<i>Beauveria bassiana</i> en agar avena. A. Estructura conidial; B. Células conidiógenas; C. Conidios	37
3	Proceso de patogénesis de los Hongos Entomopatógenos	45
4	Esquema empleado para la selección de cepas patogénicas a <i>C. capitata</i>	51
5	Esquema empleado para la determinación de CL ₉₀ y SM de cepas seleccionadas para el control de <i>C. capitata</i>	52
6	Esquema utilizado en los ensayos de compatibilidad para las diferentes concentraciones de insecticida empleadas	54
7	Compatibilidad de las cepas seleccionadas a diferentes concentraciones de insecticida (Mercaptotion)	59
8	Compatibilidad de las cepas seleccionadas a diferentes concentraciones de insecticida (Dimetoato)	59

ÍNDICE DE ANEXOS

INDICE DE ANEXOS

Núm.	Título	Pág.
1	Presencia de agentes tensioactivos en el insecticida Mercaptotion: Testigo, 50% y 200% (de izq. a der.)	77

INTRODUCCIÓN

Ceratitis capitata (Wied.) "mosca de la fruta o del Mediterráneo" es un díptero que pertenece a la familia Tephritidae. Esta plaga es originaria del Sub-Sahara en África y ha alcanzado una distribución muy amplia, abarcando la mayoría de las regiones tropicales y subtropicales del planeta. Esta se encuentra distribuida a lo largo de la región del Mediterráneo, Medio Oriente, Oeste Australiano, Estados Unidos, Centroamérica y Sur América (Thomas, *et al*, 2005). Esta plaga utiliza como hospedero a más de 260 especies de frutas, entre las cuales se encuentran el durazno, ciruela, pera, manzana, aguacate (palta), mangos, cítricos, papaya, café, guayaba, níspero, entre otros (Lanzavecchia, 2004; Ekesi, *et al*, 2005; Herrera, 2005). Otros hospederos pueden ser plantas silvestres (Lanzavecchia, 2004, Herrera, 2005) flores, vegetales y nueces (Thomas, *et al*, 2005).

El daño causado por esta mosca ocurre cuando la hembra adulta, a través de su ovipositor, penetra y deposita sus huevos dentro del fruto. Las larvas excavan galerías dentro del mismo, con lo que éste queda expuesto a la penetración de hongos y bacterias que deterioran su calidad. De igual manera, puede ocasionar una maduración a destiempo del fruto, o bien, si el ataque ocurre en estadios tiernos, estos no logran alcanzar un desarrollo adecuado. (Ekesi, *et al*, 2003; Lanzavecchia, 2004; Herrera, 2005;). Más aún, las medidas cuarentenarias impuestas por países importadores para evitar la entrada y el establecimiento de esta plaga incrementan las pérdidas económicas de los países productores (Ekesi, *et al*, 2003; Quesada-Moraga *et al*, 2006). Por lo tanto, la mosca del Mediterráneo (MM), junto con algunos otros miembros de la familia Tephritidae, constituyen el grupo de dípteros fitófagos con mayor impacto económico en el mundo (De La Rosa, *et al*, 2002).

En África, por ejemplo, la producción y exportación de frutas es uno de los sectores agrícolas de gran crecimiento. Mangos, cítricos, papaya, aguacates, café

y manzanas son productos que se exportan a Europa y Medio Oriente. Sin embargo, evaluaciones realizadas en diferentes países africanos e islas indúes revelaron que de los 1.9 millones de toneladas de mango producidos anualmente el 40% se perdió debido a daños por varias especies de mosca de la fruta, entre ellas *C. capitata* (Ekesi *et al*, 2005).

En Israel, territorios Palestinos y Jordania el costo anual del control de *C. capitata* es de US\$ 365 millones, con un valor total de la producción de sus hospederos de US\$ 611 millones. En Estados Unidos, se han estimado pérdidas del orden de US\$ 2.120 millones y en México de US\$ 511 millones (Corvalán, 2004).

El uso de agentes químicos para el control de mosca de la fruta ha sido una forma de control utilizada para esta plaga. Sin embargo, su uso continuo se ha asociado con efectos negativos tales como: contaminación ambiental, altos costos de producción, desarrollo de resistencia a los insecticidas, daño a insectos no blanco (incluidos parasitoides de mosca de la fruta) y daños a la salud humana. De igual manera, se han implementado diferentes programas de control y manejo de mosca de la fruta que incluyen la Técnica del Insecto Estéril (TIE) ó control autocida, trampas con cebos tóxicos, trampas con fuertes atrayentes de adultos, medidas cuarentenarias, control biológico con parasitoides y más recientemente con el uso de hongos entomopatógenos (Quesada-Moraga *et al*, 2006).

Los hongos entomopatógenos constituyen agentes promisorios para el control de la mosca de la fruta. Existen más de 800 especies identificadas (Thacker, 2002), dentro de los cuales *Metarhizium anisopliae* Metsch. (Sorokin) y *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin constituyen la base de la mayoría de los productos comerciales disponibles con hongos entomopatógenos (Leite, *et al*, 2003). El género *Beauveria* está compuesta por varias especies, entre ellas, *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *B. amorpha* y *B. velata*. *B. bassiana*, posee una amplia distribución geográfica y ha demostrado tener efecto patogénico sobre nueve órdenes

(principalmente Lepidoptera y Coleoptera) y más de 200 especies de insectos (Leite, *et al*, 2003; Herrera, 2005).

La susceptibilidad de adultos y pupas de *C. capitata* a hongos entomopatógenos tales como *B. bassiana* en condiciones de laboratorio ha sido reportada en algunas investigaciones. Cuando la larva de la mosca de la fruta deja el fruto y cae al suelo, ésta se torna vulnerable a la acción de estos microorganismos benéficos tal como se ha observado en otros insectos (Mochi *et al*, 2006; Quesada-Moraga *et al*, 2006). Por lo tanto, el Control Microbiano con hongos entomopatógenos debe estar dirigido hacia adultos, larvas próximas a pupar o pupas en el suelo.

El uso de biotecnologías que permitan disminuir el impacto ambiental, riesgos sobre la salud humana y disminución de costos, deben ser prioridades dentro de las nuevas tecnologías que se deseen desarrollar en el campo agrícola mundial. Para el IMYZA, este tipo de investigaciones resultan de gran trascendencia ya que se logra implementar modelos en el laboratorio necesarios para el escalado posterior en condiciones de campo, que resulten rentables y accesibles tanto al productor como al comprador. En este caso, el uso de *B. bassiana* como agente de Control Microbiano de la MM, forma parte de las actividades de investigación y desarrollo de micoinsecticidas (bioinsumos) para el control de plagas que desarrolla este Instituto.

REVISIÓN DE LITERATURA

Familia Tephritidae

La Mosca del Mediterráneo (MM) pertenece al filo Artrópoda, clase Insecta, orden Diptera y a la familia Tephritidae. Actualmente se conocen 150.000 especies de dípteros, distribuidos en 120 familias, y se cree que hay muchas más aún sin descubrir en todo el mundo. Dentro de la familia Tephritidae se han descrito alrededor de 4.000 especies en todo el mundo (Zumbado, 2006) contempladas en 500 géneros (González, 2003).

Las larvas dentro de esta familia se caracterizan por alimentarse y desarrollarse en tejidos vegetales tales como tallos, flores, frutos carnosos, semillas y agallas florales (Zumbado, 2006), mientras que el adulto se alimenta de azúcares y proteínas que obtienen de levaduras silvestres y secreciones mielosas de otros insectos.

Descripción de la plaga

Este insecto presenta las etapas de una metamorfosis completa durante su desarrollo: huevo, larva, pupa y adulto.

El huevo es alargado, de un milímetro, lechoso, blanco amarillento, con un reticulado muy fino si se observa al microscopio (Quintanilla 1946.). Una hembra depositará entre 1 y 10 huevos en una cámara dentro del fruto y hasta 22 huevos por día. Puede ocurrir que varias hembras depositen 75 o más huevos dentro de una misma perforación. Durante toda su vida la mosca produce usualmente 300 huevos, sin embargo, puede llegar a los 800 (Quintanilla 1946; Thomas, 2001).

La larva es ápoda, de color blanco amarillento, blanda y pequeña. Realiza tres mudas durante su desarrollo larval en donde el diámetro de ésta va en aumento

gradual desde la región anterior hacia la extremidad posterior. Principalmente la larva del tercer estadio presenta la particularidad de dar saltos por movimientos de contracción y expansión del cuerpo. Es importante considerar que el tipo y la condición del fruto puede afectar el período de la etapa larval (Thomas, 2001).

La pupa puede visualizarse desde un color amarillo claro que va cambiando a un color rojo pardo. La pupa se mantiene dentro de la piel de la última muda larval, la que se endurece y constituye una estructura de protección llamada pupario. Para emerger de la pupa, el adulto expande su cabeza mediante presión de la hemolinfa y utiliza un saco membranoso llamado ptilium. El ptilium se reintegra a la cabeza formando la fisura ptilinal una vez que el adulto ha emergido por uno de los extremos del pupario (Zumbado, 2006).

El adulto presenta un tamaño entre los 3,5 y 5 mm (Thomas, 2001) y en general presenta una coloración vistosa entre amarillo, gris, blanco y negro (Infoagro, 2002).

Su cabeza presenta ojos compuestos color iridiscente, oscura, con cuatro pares de cerdas fronto-orbitales, con la cara blanco grisáceo y presenta antenas aristadas. Las cerdas fronto-orbitales permiten no solo identificar los sexos dentro de esta especie, sino distinguir a esta especie del resto de las especies que se encuentran en la familia Tephritidae y que son de importancia agrícola. Por un lado, el macho presenta en el segundo par de cerdas (a partir del vértice) un agrandamiento en la zona apical en forma de rombo o espátula marcado con finas estrías longitudinales. Además, estas cerdas alargadas (en comparación a las otras) nacen de un par de tubérculos muy visibles en la frente. La hembra, si bien presenta las segundas cerdas más alargadas que las restantes, carece de los engrosamientos apicales y la base tuberculada (SAGARPA, 1995).

De modo general, el tórax va desde un color blanco crema a amarillo con manchas negras o café. Los húmeros son de color amarillo o blanquecino con una mancha

negra en la parte superior. Los húmeros presentan cerdas. El escutelo es inflado, color negro brillante, salvo por una línea angosta de color amarillo a lo largo de la base. (SAGARPA, 1995; Thomas, 2001)

El abdomen es ovalado con presencia de pequeños pelos sobre la superficie dorsal y franjas de color amarillo y gris (Thomas, 2001; Infoagro, 2002). Las hembras portan al extremo de su abdomen el ovipositor ó terebra con el cual perforaran el fruto y depositarán los huevos (Quintanilla, 1946). El sétimo tergo del abdomen constituye una cubierta protectora del ovipositor. Debido al gran tamaño de los ovarios en las hembras que han alcanzado la madurez sexual, el abdomen se observa abultado (SAGARPA, 1995).

Las alas son cortas y amplias, en promedio de 5 mm de largo por 2.5 mm de ancho, con manchas grisáceas, amarillas, negras o café oscuro muy características (SAGARPA, 1995).

Ciclo de vida

C. capitata se caracteriza por presentar un ciclo de vida muy adaptado a las diferentes condiciones climáticas donde se establece. De ahí que existan fuertes medidas cuarentenarias impuestos por los países que carecen de esta plaga.

La madurez sexual en el adulto se alcanza entre los 4-5 días después de la emergencia. La hembra adulta después de ser fertilizada, deposita sus huevos dentro del fruto, el cual, proporcionará los nutrientes necesarios para la posterior etapa larval. El orificio producido por el ovipositor, de 1-2 mm de profundidad, constituye un foco que facilita la penetración de bacterias y hongos en el fruto. La entrada de estos agentes externos produce coloraciones pardas y pudrición en los puntos de las perforaciones deteriorando así la calidad del fruto y su aceptación en el mercado.

Los huevos bajo condiciones de clima cálido, les toma entre un día y medio y tres días para pasar a la etapa larval. Dentro del fruto, las larvas se alimentan del contenido de la fruta hasta lograr alcanzar un desarrollo apropiado. Previo a caer al suelo, la larva pasará por tres estadíos larvales que en su conjunto toman entre 6 y 10 días bajo condiciones de 25 a 26°C (Thomas, 2001). La larva del tercer estadío, cae al suelo desde el fruto y se entierra a pocos centímetros de profundidad en donde pasará a la etapa de pupa.

La etapa de pupa puede durar aproximadamente 15 días (Lanzavecchia, 2004), dentro de los cuales los nutrientes acumulados por la larva se estructuran de manera tal que conformaran al adulto. Finalmente, se da la emergencia del adulto que continuará el ciclo reproductivo por varias generaciones si las condiciones ambientales lo permiten. Este, a su vez, posee un tiempo de vida entre 30-60 días.

El ciclo de vida de esta especie, desde la puesta del huevo hasta la aparición del adulto en términos generales va de los 21-30 días (Thomas, 2001), sin embargo, puede variar según las condiciones climáticas del lugar. Así, Quintanilla (1946) afirma que en condiciones de verano el ciclo de vida comprendido en el mismo lapso está entre 20-25 días y de 32-36 días en otoño.

Las diferentes etapas del ciclo de vida, pueden variar en duración según las condiciones ambientales del lugar donde se esté desarrollando el insecto (Basso, 2005). Así, por ejemplo, la pupa en verano tarda de 10 a 12 días o menos, de 10 a 20 días en otoño y de 1 a 2 meses en invierno (Quintanilla, 1946).

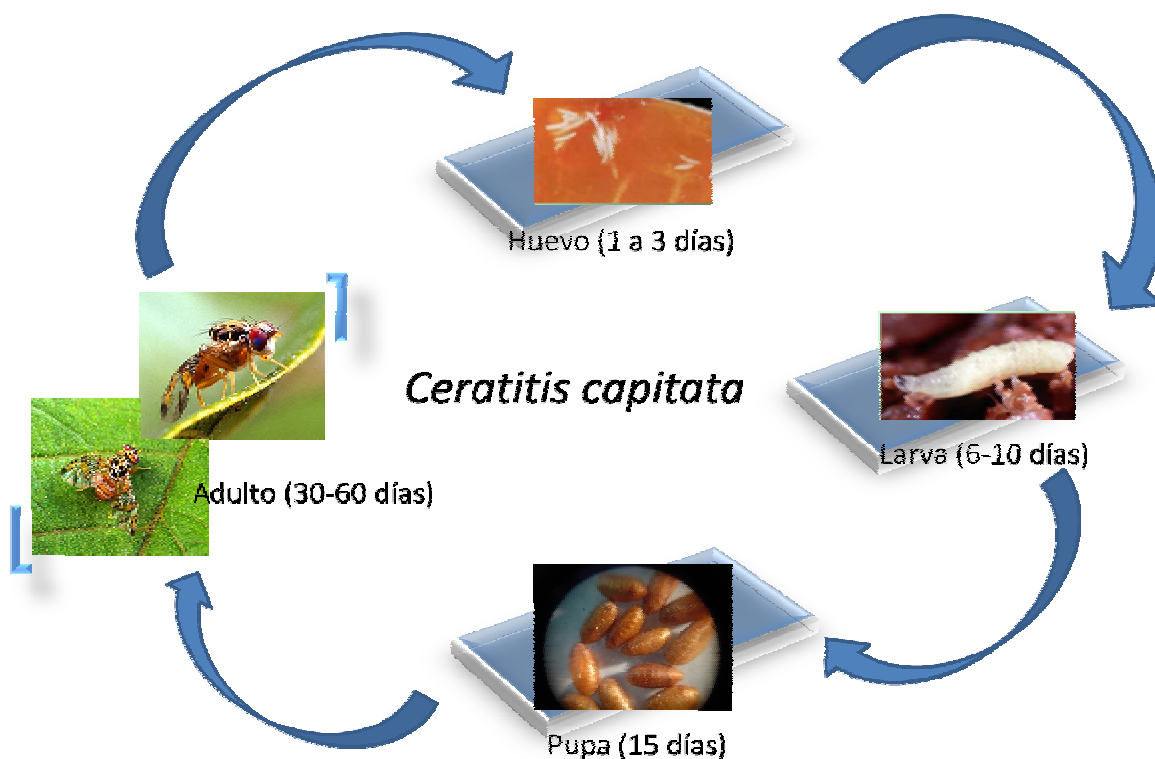


Figura 1. Etapas del ciclo de vida de la Mosca del Mediterráneo

Fotos tomadas de Lanzavecchia, www.ars.usda.gov y Laboratorio de Hongos Entomopatógenos, IMYZA.

Rango de hospederos

Esta mosca suele utilizar frutas de pulpa blanda y de exocarpo poco espeso, sin embargo, al haber escasez de estas o por exceso de población de las moscas, recurren a frutas de exocarpo grueso o plantas silvestres. Estas últimas son una importante reserva de la plaga (Lanzavecchia, 2004).

Esta plaga utiliza como hospedero a más de 260 especies frutales. Algunos de los hospederos son el durazno y nectarina (*Prunus persica*), manzana (*Malus sp.*), naranja agria (*Citrus aurantium*), limón (*Citrus limon*), toronja (*Citrus paradisi*),

mandarina (*Citrus reticulata*), naranja (*Citrus sinensis*), café común (*Coffea arabica*), café robusta (*Coffea canephora*), níspero (*Eriobotrya japonica*), mango (*Mangifera indica*), albaricoque (*Prunus armeniaca*), ciruela (*Prunus domestica*), guayaba (*Psidium guajava*), pera (*Pyrus communis*), guanábana (*Annona muricata*), anona (*Annona reticulata*), carambola (*Averrhoa carambola*), chile dulce (*Capsicum annuum*), papaya (*Carica papaya*), algodón (*Gossypium* sp.), tomate (*Lycopersicon esculentum*), aguacate (*Persea americana*), naranjo jasmín (*Murralla paniculata*), manzana rosa (*Syzygium jambos*), pitanga (*Eugenia uniflora*), entre otros. (Thomas, 2001).

Métodos para el control de la plaga

El concepto de Manejo Integrado de Plagas (MIP) trae consigo una estrategia integral basada en fundamentos ecológicos, en donde no solo se considera el cultivo, sino también el agroecosistema donde este se encuentra. Además, se buscan alternativas que permitan mantener el daño económico minimizado. En agroecosistemas donde se emplea el MIP, es común que se identifique el funcionamiento de la plaga y de los enemigos naturales, que se emplee sistemas de monitoreo (tanto para la plaga como a enemigos naturales), que se aumente la resistencia en general del agroecosistema (uso de variedades resistentes, prácticas culturales, potenciar el número de predadores de la plaga) y emplear insecticidas con características selectivas e integrado a las anteriores prácticas. En síntesis, el MIP busca una agricultura sustentable o sostenible.

Existe información relacionada al MIP de la MM y por tanto, de los diversos métodos de monitoreo y control (biológico, químico, cultural, autocida, legal) empleados; los cuales se mencionan y explican a continuación, algunos con más años de haberse empleado y otros más recientes, pero cuyo objetivo final es mantener controlada a esta plaga de gran impacto a nivel mundial.

Control Legal (Medidas Cuarentenarias)

Para evitar la movilización de la plaga (MM) a zonas donde esta es ausente se han creado medidas o acuerdos de tipo legal tanto a nivel internacional como local. En el plano internacional, estas medidas se encuentran contempladas en los países (instituciones) que importan productos vegetales y que por tanto evitan la introducción de material infestado. A nivel local, existen también instituciones encargadas de dirigir este tipo de medidas que regulen el transporte de material vegetal infestado.

La ejecución de estas medidas se hacen a través de cuarentenas, permisos fitosanitarios, certificados de origen, certificados de tratamientos al producto agropecuario, entre otros (Boscán, 1993). En el caso de *C. capitata*, se busca tratar al fruto en momentos en que el insecto está en estados inmaduros ya sea con tratamientos químicos o físicos (calor, frío, ambientes controlados, radiaciones ó una mezcla de ellos). El uso de los tratamientos químicos suelen ser más problemáticos debido a los problemas de toxicidad que pueden ocasionar al ser humano y al medio ambiente (Infoagro, 2002).

Detección y monitoreo de la plaga

Convencionalmente, para hacer monitoreos poblacionales de adultos de MM se han empleado trampas con atrayentes que estimulan la visión (colores), el olfato (olores a alimento ó sexuales) del insecto, o bien, una combinación de ambos. Los olores tienen un efecto atrayente mayor sobre el insecto a distancias largas, a diferencia de los colores que son más efectivos a cortas distancias (OIEA, 1999).

Uno de los métodos más usados a nivel mundial es el uso de trampas con cebos impregnados de Trimedlure. Esta paraferomona posee un efecto atrayente efectivo sobre los machos, no así con las hembras de la población plaga. También, se emplea el Naziman (Gazit, *et al*, 1999); el NuLure (atrayente proteico)

al 9% en combinación con 3% Borax (borato de sodio). Para monitorear poblaciones de hembras se suele utilizar con frecuencia atrayentes alimenticios, por ejemplo, a base de proteínas hidrolizadas, no obstante, su baja efectividad, baja selectividad, su manejo y mantenimiento en el agroecosistema hacen que se busquen nuevas alternativas. En casos donde se desee implementar la TIE, resulta indispensable emplear un método para detectar y monitorear a las hembras de la población, tanto para no eliminar a los machos estériles liberados, como para poder verificar el efecto esterilizante sobre los huevos de las hembras y así evaluar la eficiencia de la implementación de programas basados en la TIE (Miranda, *et al.*, 2001).

El Organismo Internacional de Energía Atómica ha promovido el uso de tres atrayentes alimenticios en hembras, como la putrescina (1,2 diaminobutano), acetato de amonio y trimetil-amina en conjunto con diferentes tipos de trampa (condiciones húmedas y secas), a diferentes densidades poblacionales de la plaga en 12 países (OIEA, 1999). La combinación de estos tres compuestos se ha observado que tienen un efecto sinérgico sobre la hembra de la MM (Miranda, *et al.*, 2001) y ha mejorado significativamente la captura de las mismas con respecto al uso de la mezcla de acetato de amonio y putrescina, y sobre cebos proteicos. De igual manera, las formulaciones comerciales con estos tres componentes tienen una duración en el campo mayor que los cebos proteicos utilizados comúnmente (OIEA, 1999).

Las trampas que se utilizan con más frecuencia son la McPhail y Jackson, sin embargo, existen otras como la Frutect, Tephri-Trap, CBDT (Closed Bottom Dry Trap) y OBDT (Open Bottom Dry Trap). En la Tabla 1 se resumen las características de cada una de las trampas anteriormente mencionadas:

Tabla 1. Trampas utilizadas para la detección y monitoreo de Mosca del Mediterráneo.

Nombre de la trampa	Descripción
Trampa Jackson	Proporciones de 12,7 x 9,5 x 8,5cm. Trampa hecha con cartulina blanca con una lámina pegajosa donde las moscas son capturadas. Contiene un dispositivo donde se pone el atrayente.
Trampa McPhail	Trampa compuesta de dos partes plásticas. La parte superior transparente (12,7 cm de largo x 16,5 cm diámetro) y la parte inferior amarilla (8 cm x 17,5 cm diámetro) con una evaginación que permite la entrada de las moscas y crear un espacio para depositar atrayentes líquidos. Las paredes del recipiente superior pueden llenarse con algún atrayente.
Trampa de fondo seco cerrado (CBDT)	Trampa cilíndrica de color verde fluorescente (15 cm x 9 cm diámetro) con tres orificios a los costados de 2 cm de diámetro para el acceso a las moscas. La tapa superior e inferior están hechas con dos cajas de Petri plásticas removibles.
Trampa de fondo seco abierto (OBDT)	Salvo por no presentar tapa inferior, las características son las mismas a la CBDT. Se utiliza un papel amarillo pegajoso para capturar las moscas que se coloca en el interior de la trampa.
Frutect	Trampa compuesta por un panel amarillo pegajoso (40x40 cm) y una esfera roja oscuro sujeta al centro del panel (12,5 cm de diámetro). Se coloca el atrayente en el interior de la esfera y se libera al exterior por medio de una esponja que forma una banda en la periferia de la misma.
Tephri-Trap	Estructura y funcionamiento muy semejante a la trampa McPhail. Presenta orificios a los costados.

Control mecánico-cultural

Dentro de este aspecto, se encierran las labores propias del manejo agrícola que permitan de manera oportuna y efectiva evitar la aparición y supervivencia de plagas (artrópodos y enfermedades) dentro de la zona cultivada. Por lo tanto, la preparación del suelo, el riego, el control de las malezas, la cosecha, la distribución del cultivo en la plantación y los tratamientos pos-cosecha deben ser aspectos a considerar dentro del control de la MM.

La sanidad dentro de la plantación debe enfocarse hacia la colecta diaria y destrucción de frutos que no van a ser comercializados o que presentan daños causados por la plaga. Esto se puede hacer enterrando la fruta a 90 cm de profundidad de la superficie y adicionando suficiente cal para matar las larvas (Mau, *et al*, 2007). También se puede sumergir la fruta en agua y eliminar el intercambio de oxígeno (mediante una capa de kerosene sobre la superficie del agua) por un periodo de cuatro a cinco días. Otra opción es congelar la fruta por varios días, cocinarla, o bien, hacer un triturado de la misma y utilizarla como alimento para animales de granja (Broughton, *et al*, 2006). Cada alternativa de control dependerá de las condiciones particulares de cada plantación.

El rastreo del suelo es una medida que permite exponer las pupas enterradas sobre la superficie, de manera tal que estas mueran por desecación, depredación (Herrera, 2005) o por el efecto de algún producto químico.

Control Químico

Dentro de los productos químicos más usados para el control de la mosca del Mediterráneo están los organofosforados, sin embargo, se reporta el uso de otros tipos de insecticidas. Algunos de ellos son el Diazinón (Dimbi, *et al*, 2003), Mercaptotion, Triclorfón, Lamdacialotrina (Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación, 2005) Fentión (Infoagro, 2002), Malatión (De la Rosa, *et al*,

2002) y Dimetoato. Muchos de los productos químicos utilizados para el control de moscas de la fruta han sido reportados entre los contaminantes orgánicos más persistentes por el Programa Ambiental de las Naciones Unidas (Dimbi, *et al*, 2003).

Dos de los métodos reportados para el uso de químicos son: la aplicación sobre el follaje con cebo atrayente y aplicaciones (spray) por cobertura (Jang, 2006). La primera se hace mediante la aplicación de un cebo atrayente, usualmente compuesto de un insecticida (poca cantidad) y proteína hidrolizada (puede también agregarse melaza o vinagre como atrayente, o una combinación de todas), que se aplican preferiblemente en horas de la mañana. El objetivo de este método es aplicar la mezcla sobre el follaje en puntos medios de los árboles sin rociar los frutos y eliminar a los adultos que sean atraídos. Se utiliza 100 ml/árbol (menos si el árbol es pequeño) aplicados al follaje durante 1 o 2 veces por semana dependiendo de las lluvias y del grado de infestación del lugar. Otras variantes que utilizan cebos atrayentes consisten en la aplicación directa de la mezcla sobre los troncos de los árboles (Dekker, *et al*, 2006); además, en los árboles ubicados a las orillas de la plantación, o bien, en forma de bandas alternas dentro de la zona de producción (SAGARPA, 2002)

En el segundo método se aplica la formulación de insecticida tanto al follaje como a los frutos. En este caso el método controla todos los estados de vida de la plaga (huevo hasta adulto) producto de la acción de penetración y contacto del insecticida, pero presenta la particularidad de matar a insectos no blanco. Este método se lleva a cabo cuando las frutas están a la mitad o a dos tercios de su tamaño completo y se suele utilizar de 5 a 10 L/árbol, según el tamaño del mismo y las condiciones ambientales del lugar (Broughton, *et al*, 2006).

Una tercera forma de aplicación es por medio de aspersiones aéreas, en donde la mezcla contiene cantidades pequeñas de insecticida, proteína, azúcar y atrayente. En estos casos se recomienda aplicar una dosis de insecticida de 1 l/ha. Se debe

hacer una aplicación total sobre las zonas del perímetro de la plantación y a lo interno se aplica en forma de bandas (SAGARPA, 2002).

En general, las aplicaciones deben repetirse cada 8 ó 10 días dependiendo de las condiciones atmosféricas y el producto químico utilizado (SAGARPA, 2002). No es recomendable aplicar durante el periodo de floración ya que esto puede provocar la caída de la flor ni después de la fructificación ya que el daño económico desaparece (Herrera, 2005).

Control Genético

La Técnica del Insecto Estéril (TIE), también llamada Control Autocida, fue concebida en 1938 por E.F. Knippling como método potencial de control del gusano barrenador, *Cochliomyia hominivorax*, causante de la miasis, enfermedad que ataca al ser humano y animales. La idea básica de su teoría era que si una hembra de la población natural se apareaba con un macho que transmitía espermatozoides genéticamente dañados, el resultado sería la producción de huevos infértiles (Basso, 2005).

La técnica consiste en la liberación de insectos estériles obtenidos por irradiación con rayos X o gamma (usualmente con los isótopos Cobalto-60 o Cesio-137) de pupas en el laboratorio. Estos insectos al ser liberados al campo deben presentar un comportamiento y conducta lo más semejantes al adulto silvestre, de manera tal que las hembras al ser fecundadas produzcan huevos inviables y por tanto, que se vaya dando una reducción de la población en las posteriores generaciones (Basso, 2005). Conceptualmente es una técnica inundativa, ya que se tiene que dar la liberación de millones de insectos estériles para asegurar que estos tengan mayores probabilidades de ser elegidos por las hembras para la cópula que los individuos salvajes (Basso, comunicación personal). Igualmente, la TIE para ser efectiva debe aplicarse a nivel regional.

Sin embargo, esta técnica presentaba diferentes problemas, entre los cuales se pueden citar (Favret, *et al*, 1995; Basso, 2005):

- I. Como las irradiaciones se realizan necesariamente durante las etapas inmaduras del insecto, los sexos no pueden distinguirse. Esto implica la liberación tanto de machos como hembras estériles.
- II. Se sabe que las hembras al ser liberadas continúan con su hábito de ovipositar sobre las frutas con lo cual se sigue dañando al fruto y aumentando la probabilidad de que el fruto se contamine por hongos o bacterias.
- III. Las dosis aplicadas de radiación que se utilizan en el laboratorio deben ser suficientes para lograr la esterilización de machos, y no causar machos aspérmicos con dosis letales. Al producir machos aspérmicos, estos pierden competitividad con los de la naturaleza por lo que se reduce la posibilidad de producir cigotos abortivos.
- IV. Costos elevados asociados a la cría, traslado y dispersión de machos y hembras. En un proyecto de erradicación a gran escala con esta técnica, lo que más dinero consume es la cría en masa de las moscas.

Dada esta situación, se buscó la manera de eliminar en etapas tempranas a las hembras de las líneas de producción mediante la diferenciación del sexo por inducción de mutaciones (translocación cromosómica) que producen variabilidad morfológica o fisiológica en estadios tempranos. En otras palabras, se han creado marcadores ligados al sexo que permitan reconocer características tales como color de espiráculos en la larva, color de pupa, sensibilidad térmica, mutantes de desarrollo lento, para eliminar el sexo no deseado (en este caso hembras) y así esterilizar y liberar solo machos. Por tanto, se aumenta la eficiencia de la técnica al eliminar la liberación de hembras, disminuyen los costos asociados a la cría de

los insectos y no se aumenta los daños asociados a la fruta. A esta mejora de la TIE se le ha llamado Técnica del Macho Estéril (TME) con lo cual se han logrado obtener líneas autosexantes que se están utilizando en ensayos a mayor escala (Basso, 2005). Cabe aclarar que para el caso de la MM es correcto utilizar tanto el término de TIE como TME para referirse a esta estrategia de control.

La TIE ha sido implementada en varios países. El primer programa contra la mosca de la fruta fue iniciado en el sur de México en 1977, cuyo objetivo era evitar la dispersión de la plaga proveniente de América Central a México y Estados Unidos (Lanzavecchia, 2004). La implementación de la TIE satisfactoriamente, ha provocado la erradicación de la Mosca del Mediterráneo en México, Chile, ciertas zonas de Guatemala y los Estados Unidos. Los programas están difundiéndose también en Argentina, el sur del Perú y el Medio Oriente (OIEA, 2002). En España y en Italia (islas Capri y Procida), son otras de las regiones donde se ha empleado la TIE con resultados muy variados (Manso, *et al*, 1990).

La TIE puede ser implementada también como control preventivo para evitar el establecimiento de moscas de la fruta. En Adelaida, Australia, se utilizó para prevenir la invasión de *C. capitata* proveniente del oeste del país. De igual manera, se aplica desde 1996 en California, Estados Unidos, previniendo nuevos focos en Los Ángeles (Lanzavecchia, 2004).

Algunas de las experiencias realizadas con la TIE para la erradicación de esta plaga han implementado cantidades tales como 217 millones de moscas estériles en una superficie de 218 km² (Miami, Florida), 10 millones de moscas estériles por semana durante 14 meses de liberación continua al sur de Perú y 205 millones de moscas estériles en California en 1975 y 1980 (Manso, *et al*, 1990).

A futuro resulta importante dirigirse hacia técnicas innovativas y con mayor valor agregado que tengan un mayor impacto en la población, que se preocupen por una liberación de insectos cada vez menor; que los individuos liberados sean muy

competitivos, o sea, que puedan dispersarse, buscar sitios de apareo, atraer hembras, copular y que transfieran esperma; que no existan barreras reproductivas entre la población a liberar y la población a controlar y que los insectos sean más longevos (capaces de alimentarse y permanecer sexualmente activos por largos períodos de tiempo) (Manso, *et al*, 1990).

Control Biológico

Dentro de las estrategias más frecuentemente empleadas para el Control Biológico están la aumentativa, manipulación del ambiente (ó conservación) y la clásica (Shah, *et al*, 2003). Esta última consiste en la regulación de la población de una plaga, que usualmente se ha establecido en una nueva zona geográfica, mediante el uso de enemigos naturales exóticos (parásitos, depredadores y/o patógenos) provenientes de su centro de origen. La introducción de un enemigo natural específico, autoreproductivo, dependiente de la densidad, con alta capacidad de búsqueda y adaptado a la plaga exótica introducida, usualmente resulta en un control permanente de la plaga (Altieri, 1995). Los casos en los que el Control Biológico clásico ha sido efectivo, resulta en grandes beneficios económicos, sin embargo, el porcentaje de éxito de estos programas se encuentra alrededor del 30%, entre otros motivos por la falta de integración entre predador y presa en los agroecosistemas (Thacker, 2002).

Existe la posibilidad de que el agente controlador pueda estar del todo ausente en el agroecosistema o en cantidades bajas que no llegan a afectar a la población plaga. En estas situaciones se puede inducir a un aumento del número de enemigos naturales, ya sea mediante métodos inoculativos ó inundativos. En el primer caso, el controlador biológico se aplica usualmente en pequeñas dosis durante etapas tempranas del periodo de producción, con la idea de que éste se mantenga de manera repetida y prolongada dentro de la población plaga y así, que se evite llegar al punto de pérdidas económicas. En el segundo caso, las aplicaciones son en mayores cantidades, con expectativas de control en periodos cortos y sin posteriores infecciones (Shah, *et al*, 2003). Desde un plano

económico, las liberaciones inoculativas resultan más baratas que las inundativas, ya que en las primeras una vez liberados los enemigos naturales estos son capaces de seguir reproduciéndose mientras que el otro requiere del cultivo ó crianza de los enemigos naturales (Thacker, 2002).

Por último, la estrategia de conservación implica crear un manejo del agroecosistema (prácticas culturales) en el que se favorezcan las condiciones para aumentar la eficiencia de los controladores biológicos (Thacker, 2002).

En el caso de la MM, se han empleado estrategias de Control Biológico clásico y aumentativa/inoculativa desde hace muchos años atrás, principalmente con parasitoides del orden Hymenoptera. Más recientemente se ha estado investigando el uso de los hongos entomopatógenos.

Los enemigos naturales que se han empleado para el control de moscas de la fruta se han basado tanto en parasitoides del orden Hymenoptera como predadores estafilínidos (Coleoptera: Staphylinidae). Estos últimos han sido utilizados muy rara vez y sin constancia de liberaciones en la zona Neotropical (Ovruski, *et al*, 2000). Los parasitoides Hymenoptera empleados para el control de moscas de la fruta se encuentran principalmente dentro de las familias Braconidae, Chalcididae, Diapriidae, Eulophidae, Eupelmidae, Eurytomidae, Figitidae (Eucoilinae), Ichneumonidae y Pteromalidae (Wharton, *et al*, 2000). Los siguientes son parasitoides que se han documentados para *C. capitata*: *Aceratoneuromyia indica*, *Aganaspis daci*, *A. pelleranoi*, *A. nordlanderi*, *Diachasmimorpha tryoni*, *D. longicaudata*, *D. fullawayi*, *Dirhinus giffardii*, *Doryctobracon crawfordi*, *D. areolatus*, *Fopius arisanus*, *F. vandenboschi*, *F. caudatus*, *F. silvestre*, *Lopheucoila anastrephae*, *Odontosema anastrephae*, *Opius* sp., *O. bellus*, *O. hirtus*, *Pachycrepoideus vindemmiae*, *Pachyneuron* sp, *Psitallia fletcheri*, *P. incisi*, *P. perproximus*, *P. concolor*, *Trichopria anastrephae*, *Tetrastichus giffardianus*, *Uteles anastrephae* (Ovruski, *et al*, 2000), *Tetrastichus giffardii*, *Bracon celer* (Wharton, *et al*, 2000), *Diachasmimorpha krausii*, *Coptera*

haywardi, *C. occidentalis*, *C. silvestrii*, *Dirhinus anthracina*, *Muscidifurax raptor*, *Ganaspis carvalhoi* (Beitia, et al, 2003) y *Fopius ceratitivorus* (López, et al, 2003).

Se ha reportado la introducción de parasitoides para el control de *C. capitata*, *Anastrepha* sp., *A. oblicua*, *A. suspensa*, *A. ludens* y *A. fraterculus* en diferentes países latinoamericanos desde 1935, entre ellos, Puerto Rico, Brasil, Argentina, México, Costa Rica, Guatemala, Nicaragua, Perú, Colombia, Bolivia, Panamá, El Salvador y Venezuela. Según Purcell (1998), el uso de parasitoides para el control de moscas de la fruta ha sido documentado con resultados positivos en Hawaii, Florida, Isla Fiji y la parte sur de Europa. En México, Australia y Costa Rica se ha dado un éxito relativamente limitado.

De manera general, el fallo en la introducción de un parasitoide puede ser atribuido a varios motivos, entre ellos, el número insuficiente de individuos liberados, métodos inapropiados de liberación como por ejemplo, la liberación en sitios pequeños con pocos hospederos disponibles, falta de adaptación de los individuos liberados a las nuevas condiciones ecológicas, cría prolongadas en el laboratorio que afecten la estabilidad genética y la especificidad de los parasitoides (Ovruski, et al, 2000).

Los programas clásicos de Control Biológico de moscas de la fruta con parasitoides, han sido poco efectivos en latinoamérica y sur de Estados Unidos debido a la falta de evaluaciones enfocadas al impacto en términos de reducción de la infestación, análisis de costo/beneficio, y estudios de seguimiento a los parasitoides liberados. Aún cuando *D. longicaudata* y *A. indica* se han considerado como especies establecidas dentro de países como Costa Rica, México, Nicaragua, Guatemala, El Salvador, Trinidad, Colombia y Venezuela su eficacia como estrategia de Control Biológico clásico ha sido cuestionado. Por otro lado, el uso de programas de biocontrol aumentativo con parasitoides pareciera ser que en algunos casos resulta una buena estrategia para el control de moscas de la fruta. En estos casos se ha utilizado principalmente los parasitoides *D. longicaudata*, *D.*

tryoni, *P. vindemiae*, *A. indica* y *F. arisanus*. En Costa Rica, liberaciones masivas de *D. longicaudata* y *P. vindemiae* en zonas aisladas ha reducido el número de *C. capitata* y *Anastrepha* sp. (Ovruski, *et al*, 2000).

Según autores, el uso de parasitoides junto con métodos compatibles como la TIE constituyen una alternativa para el control de *C. capitata* (Mohamed, *et al*, 2006; Rendon, *et al*, 2006). Esto debido a que existe tanto evidencias empíricas como razones teóricas de que la combinación de la TIE y el uso de parasitoides pueden tener un efecto sinérgico, con lo cual se mejora el rendimiento de las estrategias juntas sobre el uso de cada una por separado (Rendon, *et al*, 2006).

Generalidades de los hongos entomopatógenos

El primer microorganismo reportado como causante de enfermedad en insectos fue un hongo (Thacker, 2002), y son estos los que responden a un 80% de las enfermedades en los insectos (Mochi, *et al*, 2006). Además, se han identificado más de 800 especies de hongos entomopatógenos (HE) desde finales del siglo XIX (Thacker, 2002).

Los HE que se han utilizado en programas de investigación pertenecen ya sea a la clase Entomophthorales o Hyphomycetes, con mayor énfasis en estos últimos. Su principal diferencia, de manera general, es que los primeros establecen relaciones biotróficas con su hospedero y no presentan (ó casi nula) etapas saprófitas; mientras que los segundos poseen una etapa parasítica bien definida dentro del insecto hospedero y una fase saprófita cuando éste muere. Además, en los Hyphomycetes usualmente se asocia la muerte del hospedero a la producción de toxinas, no así con los Entomophthorales en donde la muerte es ocasionada por la colonización del tejido y poco o nada por la producción de toxinas (Shah, *et al*, 2003).

En el caso de los Hyphomycetes, éstos se encuentran comúnmente en el suelo por lo que es ahí donde infectan alguna etapa del ciclo biológico de muchos insectos. Tanto el tracto digestivo, tráquea, y heridas pueden ser medios de infección con el hongo, sin embargo, la principal vía la constituye el integumento (Toledo, *et al*, 2007).

Género *Beauveria* sp. y *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin

El género *Beauveria* es un parásito de un gran número de artrópodos, ocurriendo en más de 200 especies de insectos y ácaros. Las células conidiógenas son voluminosas hacia la base, densamente agrupadas, en espiral o solitarias y sin color. Se extienden repetidamente y hacia el ápice en zig-zag, o bien, de manera ramificada con distancias cortas justo debajo de los conidios que se van formando en la punta (Alves, 1998; Humber, 1998). Los conidios pueden ser globosos, ovoides, cilíndricos, verrugosos, o curvados (Alves, 1998).

Se han descrito además, las especies *B. brogniartii* (Sacc.) Petch, *B. amorpha* (Höhn.), *B. velata* Samson & H.C. Evans, *B. caledonica* Bissett & Widden, *B. arenaria* (Petch), *B. brumptii* Langeron, *B. chiromensis* Sawada, *B. laxa* Petch, *B. epigea* (Brunaud) Langeron, *B. felina* (DC.) J.W. Carmich., y más recientemente *B. malawiensis* S.A. Rehner & Aquino de Muro (2006) y *B. sobolifera* Zuo Y. Liu, Z.Q. Liang, Whalley, A.Y. Liu & Y.J. Yao (2001) (Index Fungorum, 2007).

Específicamente, *B. bassiana* fue inicialmente estudiado por el italiano Agostino Bassi en su trabajo sobre la infección en larvas del gusano de seda en 1835. Esta especie es de ocurrencia generalizada por lo que puede encontrarse en todos los países del mundo. Las principales fuentes del hongo son tanto artrópodos como el suelo, en donde puede permanecer por largos periodos de tiempo.

B. bassiana pertenece al phylum: Ascomycota, clase: Sordariomycetes, orden: Hypocreales, familia: Clavicipitaceae (Humber, 1998). Es importante aclarar que

todos los géneros de Hyphomycetes entomopatógenos actualmente se les conoce su estado sexual (teleomorfo) agrupándolos dentro de los Clavicipitales (Shaj, *et al*, 2003). En el caso de *B. bassiana* (anamorfo) su fase sexual recibe el nombre de *Cordyceps bassiana* (Sung, *et al*, 2007). Recientes publicaciones emplean esta nueva clasificación de *B. bassiana* (Quesada-Moraga, *et al*, 2005; Athanassiou, *et al*, 2006; Meyling, *et al*, 2007)

En condiciones *in vitro*, las células conidiógenas poseen una forma globosa o de botella, algunas veces elongadas en la base. Tienen células terminales muy sutiles, con un raquis geniculado o irregularmente doblado (20 µm de largo o más) formando denticulos. Los conidios son blásticos, hialinos, lisos, globosos o elipsoidales. En sustratos naturales, el micelio posee un aspecto granular-pulverulento, rara vez forma sinemas (conidióforos muy juntos), que pueden ser de color blanco, amarillento o rojizo con menos frecuencia (De Hoog, 1972; Humber, 1998).

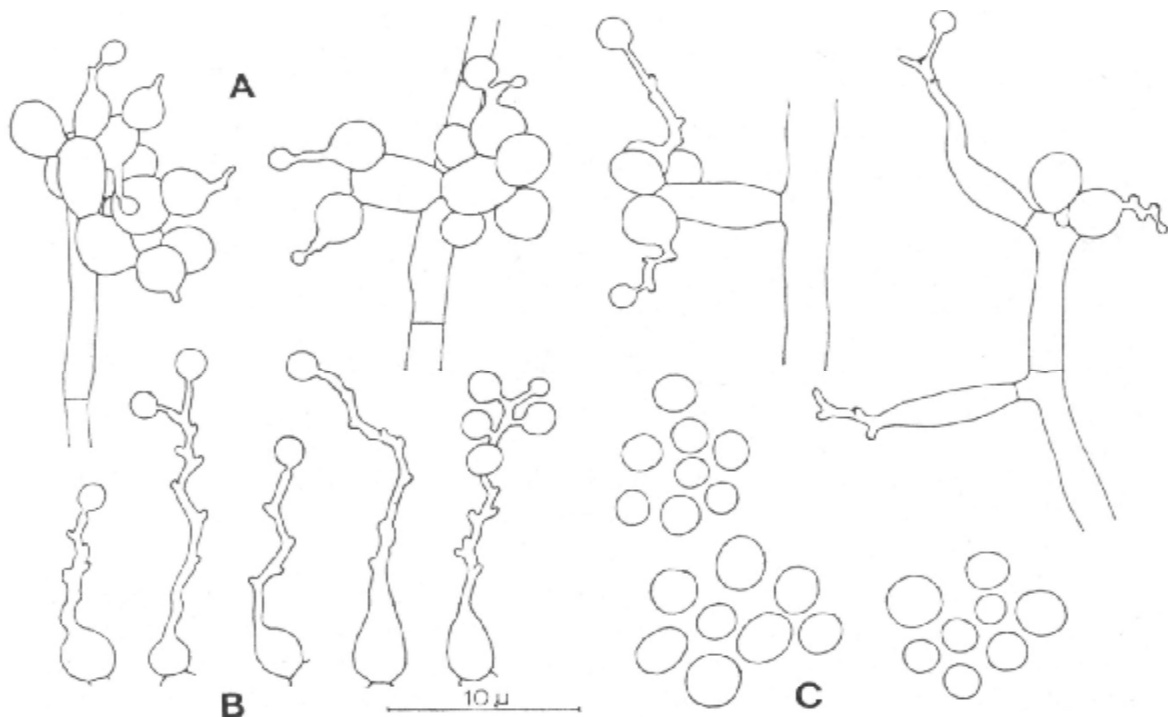


Figura 2. *Beauveria bassiana* en agar avena. A- Estructura conidial; B- Células conidiógenas; C- Conidios. Fuente: De Hoog, 1976

Su uso se ha extendido al control de muchas plagas en el campo. Por ejemplo, en China se ha utilizado a gran escala para el control de *Ostrinia nubialis* (Alves, 1998). También en *Leptinotarsa decemlineata* en papa, *Cydia pomonella* en frutales, *Dendrolimus* sp. en plantaciones forestales (Lecuona, 1996), *Diatraea saccharalis* en caña de azúcar, *Hypothenemus hampei* en café, *Plutella xylostella* (Herrera, 2005), *Lygus lineolaris* (Leland, et al, 2006) entre otros. De igual manera a nivel de laboratorio son muchas las plagas con las que se ha trabajado, entre las cuales, se puede mencionar *Haematobia irritans* (Angel-Sahagún, et al, 2005), *Metamasius spinolae* (Tafoya, et al, 2004), *Delia antiqua* (Davidson, et al, 2005), *Triatoma infestans* (Lecuona, et al, 2001), *Sitophilus granarius* (Athanassiou, et al, 2006), *Bemisia tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum* (Quesada-Moraga, et al 2005), *Musca domestica* (Lecuona, et al, 2005), *Rhipicephalus microplus* (Boophilus) (Bahense, et al, 2003), *Mononychellus tanajoa* (Barreto, et al, 2004), entre otras.

Etapas infectivas de un hongo entomopatógeno

Adhesión

Esta etapa compleja permite que la estructura fúngica (propágulo) que desencadenará el proceso patogénico logre colocarse sobre la superficie del hospedero. En la adhesión intervienen tanto mecanismos físicos, químicos, como electrostáticos, siendo también un proceso que puede ser pasivo y no específico, sin requerimiento de energía o activo y específico, que requiere de cofactores y energía, iones, carbohidratos, lípidos, glucoproteínas, etc. (Lecuona, 1996).

Existen fuerzas electrostáticas que intervienen en la adhesión de los hongos al hospedero, cuya intensidad dependerá de la especie del hongo. La adhesión de los conidios al tegumento del insecto parece estar relacionada con un conjunto de microbastones de naturaleza lipoprotéica u otra composición química (Alves, 1998). Otras sustancias como los mucopolisacáridos (mucilaginosas), localizados en la pared de los conidios, son compuestos que se ha demostrado que median

en el proceso de adhesión. De igual forma, intervienen lectinas (moléculas proteicas o glicoproteicas) en la aglutinación o precipitación de carbohidratos complejos que facilitan la adhesión entre hongo y hospedero (Lecuona, 1996).

Previo al proceso de adhesión debe existir la presencia de enzimas sobre la superficie del conidio, como esterases y proteasas, que permitan al hongo penetrar el tegumento del insecto y por tanto, contar con los nutrientes necesarios para poder germinar (Alves, 1998).

Germinación

Bajo condiciones favorables de humedad, temperatura, pH, oxígeno y nutrientes el hongo logra germinar sobre el insecto, produciendo el tubo germinativo (Ver Figura 3). Las condiciones óptimas para la germinación dependerán de la especie y del origen de los aislamientos, por lo tanto, se hace indispensable la evaluación previa de las cepas bajo condiciones de laboratorio para delimitar las condiciones que faciliten la germinación del conidio. De modo general, para los Hongos Imperfectos bajo condiciones de laboratorio, la germinación puede ocurrir en no menos de 12 horas, a una temperatura entre 23-30°C y una humedad relativa superior al 90% (Alves, 1998). En el caso particular de *B. bassiana* su temperatura óptima de crecimiento se encuentra cerca de 23-25 °C (Ferrón, 1981).

La germinación de una cepa sobre el tegumento del insecto se asociaba a un evento parasitario específico, sin embargo, esta asociación ha sido demostrada que no puede ser generalizada y dependerá de cada situación particular en la que interaccionen hospedero y patógeno (Lecuona, 1996).

Un vez que se inicia el desarrollo del tubo germinativo sobre la superficie puede ser que éste logre penetrar la cutícula del insecto, o bien, que se forme el apresorio en la parte terminal del tubo germinativo (Lecuona, 1996). El apresorio constituye un extremo dilatado del tubo germinativo (Ver Figura 3) en donde

ocurre una constante actividad metabólica producto del funcionamiento y acumulación de estructuras citoplasmáticas, principalmente mitocondrias, ribosomas y otros componentes nucleares. Esta estructura se puede encontrar en géneros como *Beauveria*, *Metarhizium*, *Erinia*, *Neozygites* (Alves, 1998), así como en *Paecilomyces farinosus* (Holm) y *Zoophtora radicans* (Bref.) (Lecuona, 1996).

La velocidad con que ocurre el proceso germinativo depende de la cepa, de las condiciones ambientales y de las condiciones térmicas previas del conidio; está última en el laboratorio. La presencia de aminoácidos, esteroides y hexosas puede beneficiar la germinación de la espóra, no obstante, ácidos grasos (de 6 a 12 Carbonos), lípidos, fenoles y microflora saprófita presente sobre la superficie del hospedero puede afectarla. (Alves, 1998)

Penetración

Inicialmente se forma el campo de penetración, que ocurre justo debajo del apresorio y en donde sobresalen hifas muy finas cuya función será penetrar la epicutícula y procutícula del tegumento del insecto (Alves, 1998).

En la penetración están envueltos dos procesos importantes; uno físico y otro enzimático. El primero, ocurre con la presión ejercida por la hifa terminal que rompe las áreas membranosas y esclerosadas de la cubierta del insecto y el segundo a través de proteasas, lipasas y quitinasas que facilitan la penetración del hongo y la actividad metabólica del tubo germinativo (Alves, 1998). La producción enzimática del hongo está relacionada con el orden estructural de los diferentes sustratos sobre los que actúa: ceras, proteína y quitina. La tripsina, quimiotripsina, elastasa y quimioelastasa, entre otras, son algunas de las proteasas que han logrado ser identificadas (Lecuona, 1996).

Tanto el aparato bucal, espiráculos, ano, sifón respiratorio, tarso y membranas intersegmentales son sitios vulnerables a la penetración del hongo en el insecto.

Por lo general, las membranas intersegmentales del abdomen son el sitio más común de entrada de los hongos (Alves, 1998).

Multiplicación del hongo dentro del hospedero

El ingreso de agentes externos ajenos al insecto (hongos, bacterias, virus) genera una respuesta inmune en este por medio de diferentes mecanismos, tales como encapsulación, nodulación, entre otros. Sin embargo, el principal mecanismo de defensa es el de encapsulación, en donde los plasmotocitos o granulocitos rodean el “cuerpo extraño” formando un pseudotejido llamado granuloma. Para que lo anterior ocurra, debe existir un reconocimiento previo por parte del hospedero hacia el agente externo que ingresa, para lo cual se ha observado que podrían intervenir lectinas específicas y la enzima fenoloxidasa en el hemocele. (Lecuona, 1996). Sin embargo, hongos como *Beauveria* y *Metarhizium* producen toxinas que erosionan el granuloma y permiten que las blastosporas puedan invadir el hemocele (Ferron, 1981).

Una vez finalizada la penetración de las hifas en el insecto, empieza la colonización del mismo. La hifa que penetra sufre un engrosamiento y se ramifica inicialmente sobre el tegumento y posteriormente en el hemocele. El crecimiento micelial dentro del hospedero induce síntomas fisiológicos anormales tales como convulsiones, falta de coordinación y comportamientos alterados (Herrera, 2005)

El hongo suele dividirse principalmente por gemación generando estructuras miceliales unicelulares tales como las blastosporas en los Hongos Imperfectos (Lecuona, 1996), protoplastos e hifas en los Entomophtorales (Alves, 1998). El hongo no alcanza un crecimiento hifal muy desarrollado dentro del insecto previo a su muerte, sin embargo, y si las condiciones son apropiadas, este logrará crecer interiormente abarcando todos los tejidos después de la muerte del insecto (Alves, 1998).

Producción de toxinas

Una vez que el hongo va colonizando el interior del hospedero, este sintetiza sustancias tóxicas que pueden tener efecto insecticida o inhibitorio de las reacciones de defensa del hospedero. Los hongos entomopatógenos pueden producir dos tipos de toxinas: Macromoléculas proteicas y sustancias de bajo peso molecular. Entre las primeras se pueden citar proteasas (*B. bassiana*, *M. anisopliae* y *Cordyceps militaris*), lipasas (*A. flavus* y *M. anisopliae*), una glicogenasa (*M. anisopliae*), una amilasa (*B. bassiana* y *A. flavus*) y una quitinasa (*B. bassiana*). Con respecto a las segundas se pueden mencionar la beauvericina, beauverolide, bassianolide, enniantin (A y C), leucinostatine, ácido dipicolínico, aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ y G₂), bassianina, tenellina y oosporeína (Lecuona, 1996).

Tabla 2. Principales toxinas producidas por hongos entomopatógenos.

Hongo Entomopatógeno	Toxinas
<i>Aspergillus spp.</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>A. ochraceus</i>	Echinocandine, ferricromo, fungisporina Aflatoxinas, Asperentina Aspocracina
<i>Beauveria bassiana</i>	Beauvericina, beauverolides, isarolites, tenellina, bassianina,, ciclosporina (A, C), oosporeina, ácido oxálico, bassianolide, bassiacridina, enniantina (A, A1, B, B1,C)
<i>B. brogniartii</i>	Beauverolides, isarolites, tenellina, bassianina, oosporeina, ácido oxálico
<i>Cordyceps</i>	Cordicepina
<i>Entomophthora</i>	Derivados de ácido carboxílico y dicarboxílico.
<i>Hirsutella thompsonii</i>	Hirsutelinas
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Destruixinas, citocalasinas
<i>M. flavoviride</i>	Viridoxinas
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	Bauvericina, beauverolide L
<i>Tolyocladium</i>	Efraeptinas, ciclosporinas

Fuente: Alves, 1998; Nicoletti, *et al*, 2000 Fuguet, *et al*, 2004; Uhlig, *et al*, 2004.

Muerte del insecto

En los Hongos Imperfectos, la muerte del insecto puede darse previo a que se dé una colonización total del hongo dentro del insecto. La muerte del hospedero, mediada en parte por sustancias tóxicas secretadas por el hongo, marca el final de la etapa parasítica del hongo e inicia la fase saprófita del mismo (Lecuona, 1996). Ante eventuales competidores, estos hongos producen sustancias antibióticas que les permite inhibir el crecimiento de otros microorganismos saprófitos que viven dentro o sobre el insecto.

En su mayoría, los Entomophthorales causan la muerte cuando el hongo invade la totalidad del insecto (100% parasítico) o bien, casi la totalidad de este. En este último caso, la etapa saprófita es muy reducida (Lecuona, 1996).

Colonización

Una vez que muere el insecto, el hongo invade todos los órganos y tejidos del hospedero. La colonización de los diversos órganos, si bien no siempre ocurre tan estructurada, se ha sugerido que puede seguir la siguiente secuencia: tejido graso, sistema digestivo y tubos de Malpighi, hipodermis y sistema nervioso, músculo y traquéidas. (Alves, 1998). Al colonizar la parte interior del hospedero, el hongo logra preservar sus estructuras que le permitirán estar presentes aún bajo condiciones ambientales adversas. La acción de sustancias antibióticas tales como oosporina en *B. bassiana*, ayudan a que el hongo pueda crecer en el insecto limitando la intervención de otros microorganismos. (Ferron, 1981; Lecuona, 1996; Alves, 1998)

Salida del hongo hacia el exterior

Una vez que el hongo desarrolló una masa micelial interna en el hospedero, estas inician un proceso de emergencia hacia el exterior del insecto siempre y cuando

las condiciones ambientales lo favorezcan. Así, condiciones húmedas y temperaturas cálidas permitirán que el hongo colonice la parte exterior del insecto, principalmente a través de zonas poco esclerosadas del tegumento tales como espiráculos o membranas intersegmentales (Lecuona, 1996).

Esporulación

Las hifas al penetrar el tegumento, pueden quedar en una etapa vegetativa o bien, pasar a la etapa reproductiva en la que se da la formación de esporas (esporulación) o conidios bajo condiciones de alta humedad ambiental. Es en esta etapa donde se reconoce el color característico de cada especie de hongo (Ver Figura 3) (Lecuona, 1996).

Diseminación

Finalmente, los conidios o esporas al quedar expuestos al ambiente son diseminados por acción del viento, agua, el ser humano u otros organismos. (Lecuona, 1996; Alves, 1998).

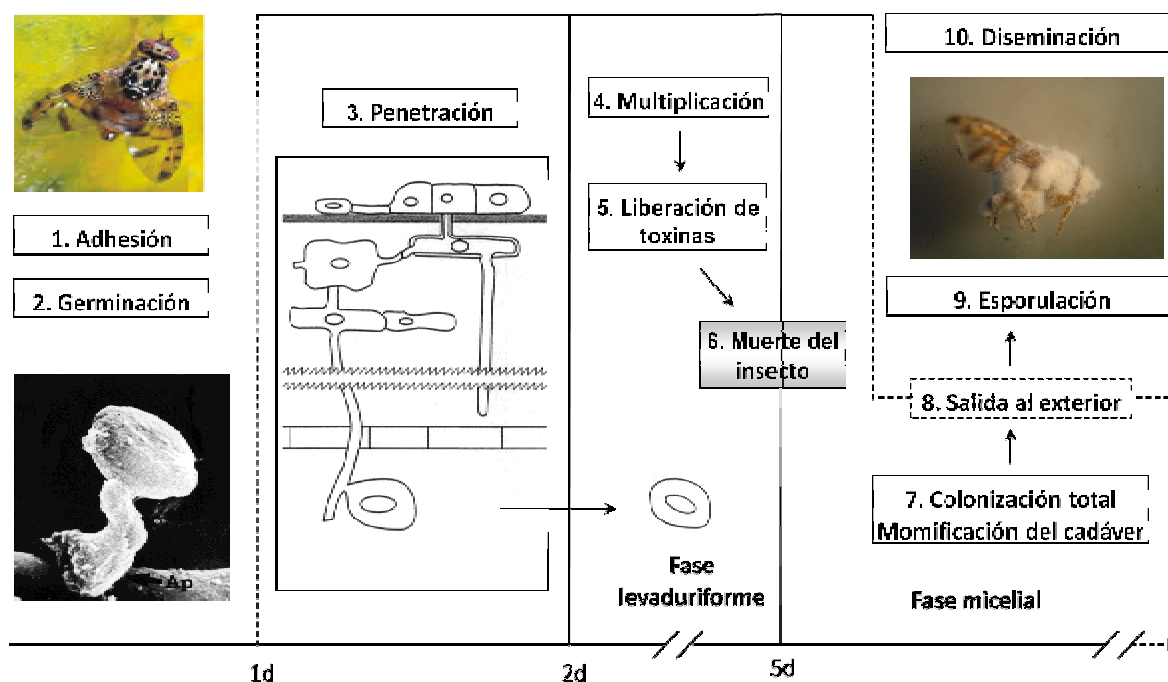


Figura 3. Proceso de patogénesis de los Hongos Entomopatógenos. Fuente: Laboratorio Hongos Entomopatógenos, IMYZA.

Uso de hongos como Micoinsecticidas

Para el desarrollo de micoinsecticidas se han logrado establecer sistemas de producción que utilizan diferentes estructuras fúngicas como lo son los conidios, blastosporas, micelio y esporas de resistencia. Sin embargo, los conidios constituyen los propágulos más adecuada para su uso en el control biológico, principalmente por ser resistentes a condiciones ambientales adversas y por su mayor preservación en el tiempo (Leite, *et al*, 2003).

Faria, *et al*. (2007) reportaron un total de 171 productos, entre micoinsecticidas y micoacaricidas, de los cuales 125 se encuentran en estado activo (producto registrado, en vía de registro, disponible comercialmente o por encargo), 25 inactivos y 17 productos cuyo estado actual no se pudo determinar. Dentro de estos 125 productos activos, 45 son a base de *B. bassiana* con acción sobre insectos del orden Coleoptera, Lepidoptera, Hemiptera, Thysanoptera, Ortoptera, Diptera, Hymenoptera, entre otros.

En Latinoamérica, países como México, Honduras, Guatemala, Nicaragua, Costa Rica, Colombia, Brasil y Argentina han desarrollado productos comerciales a base de *B. bassiana*. Tanto Brasil como Colombia, son los países latinoamericanos que cuentan con un mayor desarrollo de micoinsecticidas (comercialmente disponibles) con *B. bassiana*. Otros países como España, Sudáfrica, India, Japón, Rusia y Estados Unidos también cuentan con micoinsecticidas a base de *B. bassiana* disponibles comercialmente. En general, es importante mencionar que la gran mayoría de productos desarrollados comercialmente se concentran en Sur América, seguidos por los Estados Unidos, Europa y Asia, América Central, África y Oceanía (Faria, *et al*, 2007).

OBJETIVOS

Objetivo General

Seleccionar cepas promisorias de *Beauveria bassiana* para el control de la Mosca del Mediterráneo (*Ceratitis capitata*) bajo condiciones de laboratorio.

Objetivos Específicos

Seleccionar cepas de *B. bassiana*, virulentas para el control de la Mosca del Mediterráneo bajo condiciones de laboratorio.

Establecer un procedimiento bajo condiciones de laboratorio para inocular con el hongo entomopatógeno *B. bassiana* adultos de la Mosca del Mediterráneo.

Determinar parámetros de Concentración Letal 90 (CL₉₀) y Sobrevivencia Media (SM) con las diferentes cepas seleccionadas.

Evaluar la compatibilidad de insecticidas aprobados y utilizados para el control de la Mosca del Mediterráneo con las cepas seleccionadas de *B. bassiana*.

Determinar y comparar la producción de cada una de las cepas seleccionadas de *B. bassiana*.

MATERIALES Y MÉTODOS

A partir del cepario de *B. bassiana* se hizo un *screening* con el propósito de seleccionar posibles cepas para el control de *C. capitata*. Posteriormente, con las cepas seleccionadas en la etapa anterior, se determinó la Concentración Letal 90 (CL₉₀), Sobrevivencia Media (SM), compatibilidad con insecticidas y ensayos de producción. Todo el proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Hongos Entomopatógenos del IMYZA, INTA, Castelar, Buenos Aires, Argentina.

Los insectos (*C. capitata*) utilizados fueron proporcionados por el Laboratorio de Mosca de la Fruta del Instituto de Genética “Ewald Alfredo Favret” (INTA-Castelar). Las etapas previas a la pupa fueron mantenidas a 25°C, 80% de humedad relativa (HR) con una dieta a base de zanahoria (cocida y cruda), harina de maíz, azúcar y levadura en polvo.

Las cepas de hongos de *B. bassiana* (Cepario del Laboratorio de Hongos Entomopatógenos) utilizados para los ensayos se obtuvieron tras 22 días de cultivo bajo condiciones controladas de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ y en oscuridad. El medio empleado fue un Medio Completo (MC) con fosfato monopotásico 0,4g/L, fosfato disódico 2,1g/L, sulfato de magnesio 0,6g/L, cloruro de potasio 1g/L, nitrato de amonio 0,7g/L, glucosa 10g/L, extracto de levadura 5g/L, agar 15g/L, cloranfenicol 0,5g/L y agua destilada.

Selección de cepas

En esta etapa, se seleccionaron las cepas con crecimiento más uniforme y con mayor grado de esporulación. Para lograr extraer conidios, se colectó el hongo (deslizándolo con una espátula sobre el medio) a partir de los cultivos en las cajas de Petri y se colocó en un tamizador, el cual se agitó por un periodo de 5 min para obtener el inóculo (polvo blanco).

Es importante aclarar que la concentración de conidios que se estableció para los ensayos de este *screening* es de 5×10^9 conidios/m², aplicados como una dosis de inóculo (mg) y no como una suspensión. Una vez que se obtuvo el inóculo, se procedió a cuantificar la concentración de conidios presentes en éste. Para esto se pesó una cantidad de 1 mg de inóculo y se adicionó en un tubo de ensayo con 10 ml de agua destilada y Tween 80 al 0,05%. Se agitó esta suspensión y se determinó el número de conidios mediante el uso de la cámara de Neubauer, utilizándose la siguiente fórmula:

$$C = P \times Fc \times Fd$$

Donde,

C: Concentración (conidios/ml ó mg)

P: Promedio de conidios

Fc: Factor de la cámara

Fd: Factor dilución

Después de determinar la cantidad de conidios/ml ó mg (dado que se adicionó 1 mg) del inóculo, se determinó la viabilidad de las cepas. Esto se realizó mediante diluciones seriadas decimales en tubos de ensayo con 9 ml de Tween 80 al 0,05% y agua destilada. Es decir, que a partir de la suspensión inicial se fueron pasando alícuotas de 1 ml entre los tubos de ensayo con 9 ml de agua destilada + Tween 80 0,05% hasta llegar al orden de 10^2 . Cada vez que se echaba la alícuota se utilizaba un agitador para homogenizar la suspensión. Las diluciones seleccionadas se cultivaron por duplicado adicionando 0,1 µl en cajas de Petri con MC + cloranfenicol 0,5g/l. Esta etapa se hizo bajo condiciones estériles en la cámara de flujo laminar. Las cajas de Petri se incubaron a 26°C, se verificó el conteo de conidios germinados a los tres días pos- cultivo y se expresó el dato en términos UFC/mg. El resto de inóculo fue almacenado en papel aluminio, dentro de una bolsa plástica sellada con sílica gel, bajo refrigeración, hasta el conteo de conidios germinados.

Cada ensayo por cepa constó de cuatro repeticiones y un testigo. El testigo tenía 30 pupas, dieta sin inóculo y agua. En cada repetición, se colocaron 30 pupas próximas a emerger en un recipiente plástico cilíndrico de 2 cm (d) x 0,5cm (a). Se puso la dieta dentro de una caja de Petri de 9 cm de diámetro. La dieta que se empleó fue una mezcla de levadura y azúcar en una proporción de 3:1, respectivamente. La cantidad de inóculo (mg) en polvo suministrada sobre la superficie de la caja de Petri ($63,6\text{cm}^2$) equivale a 5×10^9 conidios viables/ m^2 . Ésta se colocó lo más uniformemente sobre la dieta de cada repetición. Cada caja de Petri se introdujo dentro de jaulas cilíndricas de 13,5cm (d) x 23cm (a) a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ y un 40-60% HR. Se suministró agua diariamente mediante el humedecimiento de algodón. De igual forma se procedió con cada cepa que se evaluó.

Para esta etapa, se evaluó solo la mortalidad. Las evaluaciones se hicieron cada dos días durante 17 días a partir del momento en que nació el primer adulto y consistieron en sacar las moscas muertas de cada jaula y llevar registro de estas.

Para confirmar la micosis en los adultos muertos, éstos se colocaron en cámaras húmedas en condiciones favorables para el crecimiento y esporulación del hongo ($26 \pm 2^\circ\text{C}$ y oscuridad). En casos de duda, se procedió con ayuda de la lupa estereoscópica, a tomar una muestra directamente del insecto. Ésta se colocó en un portaobjetos con una gota de azul de algodón en ácido láctico y una gota de alcohol al 70%. Se colocó un cubreobjetos y se observó al microscopio.

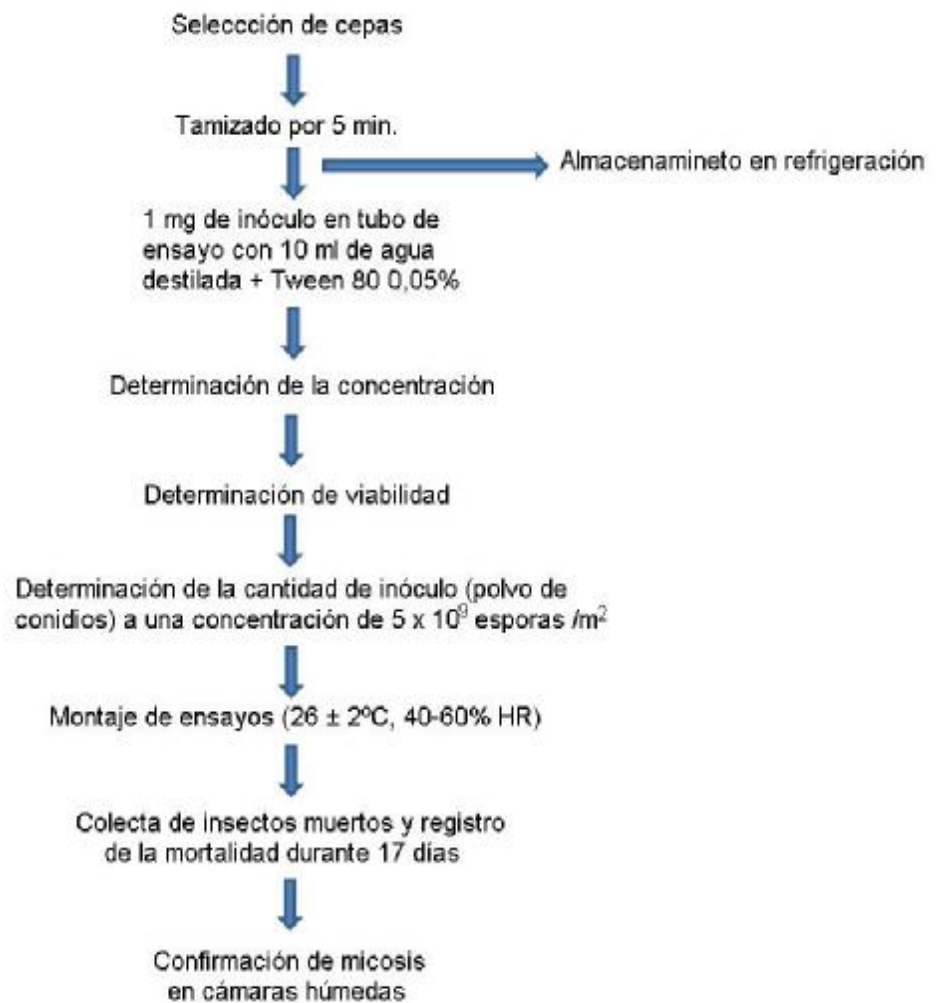


Figura 4. Esquema empleado para la selección de cepas patogénicas a *C. capitata*.

Ensayos de Concentración Letal 90 (CL₉₀) y Supervivencia Media (SM)

A partir de las 4 cepas seleccionadas en el *screening* se procedió de la misma manera que en la etapa anterior, con la variante de que se trabajó a diferentes concentraciones: 1×10^{10} conidios viables/m², 5×10^9 conidios viables/m², 1×10^9 conidios viables/m² y 5×10^8 conidios viables/m² para cada cepa seleccionada. Por lo tanto, se emplean diferentes cantidades de inóculo/m² según la viabilidad de los conidios obtenidos con cada cepa.

Además, en este caso se trabajó con 3 repeticiones y un testigo. El número de pupas utilizadas fue de 30 y el testigo constó de dieta sin inóculo y agua. Cada caja de Petri con dieta e inóculo se colocó dentro de jaulas cilíndricas de 13,5cm (d) x 23cm (a) a $26 \pm 2^\circ\text{C}$, y un 40-50% HR. Se suministró agua diariamente mediante el humedecimiento de algodón.

Se evaluó la mortalidad diariamente durante 17 días a partir del momento en que nació el primer adulto. Es importante aclarar que las pupas venían de una cría del mismo día por lo que sus nacimientos eran muy semejantes entre tratamientos. Para confirmar la micosis se procedió de la misma manera que en el *screening* de cepas.

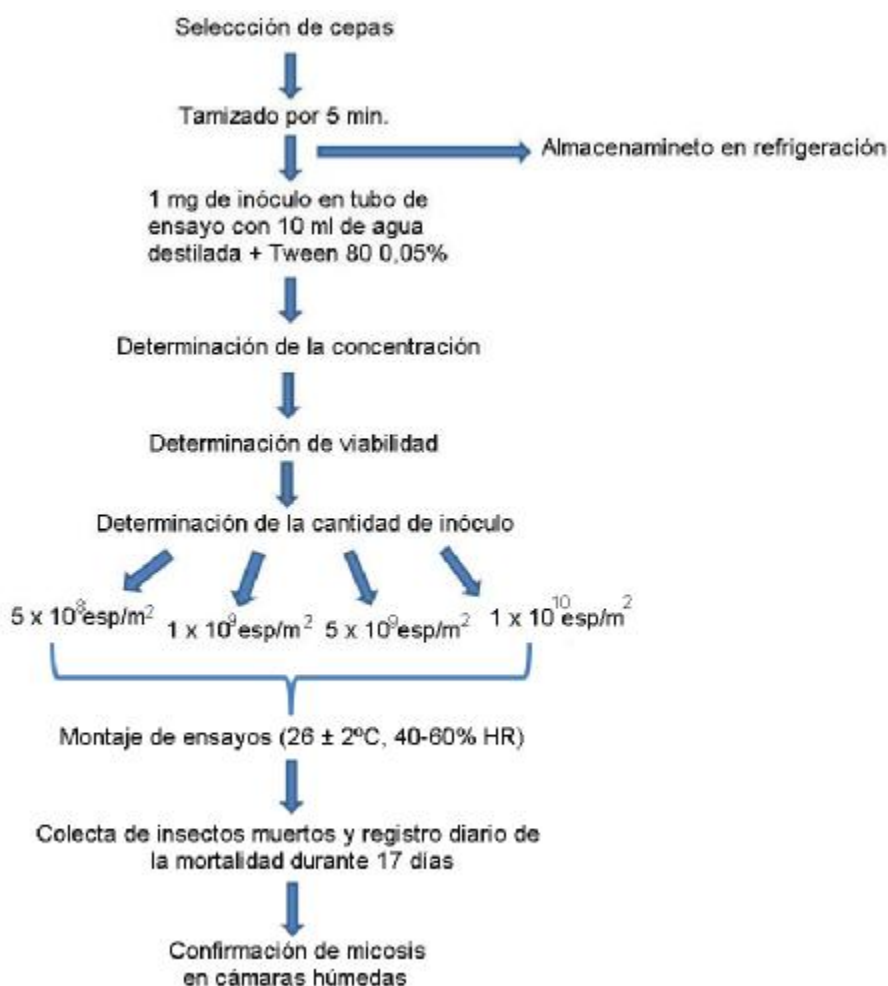


Figura 5. Esquema empleado para la determinación de CL_{90} y SM de cepas seleccionadas para el control de *C.capitata*.

Ensayos de compatibilidad con insecticida

A las cepas seleccionadas se les realizó ensayos de compatibilidad con los insecticidas Mercaptotion 100% CE (Lupara®) y Dimetoato 40% CE (Sistémico Icona), ambos avalados por la Secretaria Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), ente oficial argentino. Las concentraciones aplicadas del insecticida fueron al 50, 100 y 200% de la dosis recomendada por el fabricante.

Se colocó 100 ml de Medio Completo Líquido (MCL) + Cloranfenicol 0,5 g/L en 8 erlenmeyers de 250 ml. Estos se autoclavaron durante 20 minutos a 121°C (1kg/cm² de presión). Los 8 erlenmeyers se estructuraron de la siguiente manera: Dos erlenmeyers para el 50%, dos para el 100%, dos para el 200% y dos testigos que tenían el hongo en el MCL sin el insecticida.

En la cámara de flujo laminar, se preparó una suspensión de conidios con una concentración de 1×10^8 conidios/ml en un tubo de ensayo con 10 ml de Tween 80 al 0,05%. A partir de esta suspensión, se inoculó con 200 µl cada uno de los 10 erlenmeyers. Además, se adicionó el insecticida según las concentraciones y la distribución anteriormente descrita.

La mezcla de *B. bassiana*-insecticida se pasó a un agitador a 200 rpm, 26°C, por 20 horas. Al día siguiente, se procedió a determinar la viabilidad de los conidios en la mezcla y el testigo. Para esto se diluyó 10 000 veces a partir de la solución madre y posteriormente se inoculó y esparció 0,1 ml en placas con MC con cloranfenicol (0,5g/L). Las placas se incubaron a 26°C, en la oscuridad, y se revisaron a los tres días después de la inoculación, donde se determinó las UFC. Por cada concentración se hicieron dos tratamientos; de cada uno de éstos se hicieron diluciones seriadas y a partir de las diluciones seleccionadas se cultivaron

dos placas. Adicionalmente, de cada erlenmeyer se cultivaron directamente dos placas (Ver Figura 6).

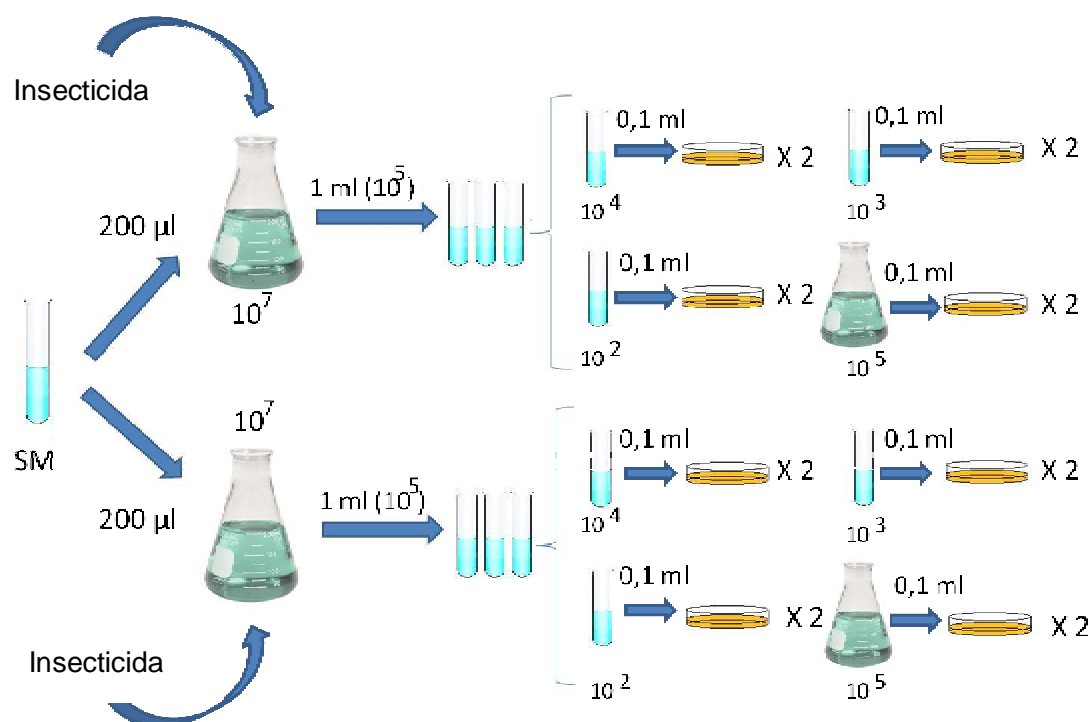


Figura 6. Esquema utilizado en los ensayos de compatibilidad para las diferentes concentraciones de insecticida empleadas.

Determinación de la producción de cepas seleccionadas

Se emplearon matrices de arroz para determinar la producción de cada una de las cepas. Bajo condiciones estériles, se colectó conidios directamente de las cajas de Petri para preparar una suspensión con una concentración de 1×10^8 conidios/ml en tubos de ensayo con 10 ml de agua destilada + Tween 80 al 0,05%.

Se pesó 90 g de arroz parborizado y se colocó en bolsas plásticas estériles para autoclavar. A cada bolsa plástica se le adicionó 40 ml de agua destilada y se dejó aproximadamente 15 minutos hasta que el arroz absorbió el agua. Las bolsas (3 repeticiones/cepa) se colocaron sobre una superficie plana y se esparció el arroz

dentro de la misma hasta que quedara una lámina de un grano de espesor, esta se cerró con una banda elástica y se autoclavó durante 20 minutos a 121°C (1kg/cm² de presión). Cuando finalizó el ciclo de autoclave se dejó enfriar el arroz y se inoculó, en la cámara de flujo laminar, 1 ml de la suspensión de conidios en cada una de las bolsas. Luego, se hizo una cámara de aire en el interior de las bolsas, esta se cerró e incubó a 26°C en oscuridad durante 15 días. Diariamente, las bolsas se agitaron para evitar la formación de agrupaciones con los granos de arroz.

Luego del periodo de incubación se colocaron las bolsas en la sala de secado a una temperatura de 18°C durante 15 días (a una HR aproximada del 20%). A cada bolsa se le hizo una abertura de manera que quedase expuesta a las condiciones de temperatura y humedad de la sala. Esta sala contaba con un deshumificador de ambiente. Después del secado, se introdujo cada bolsa por separado en distintos tamices, estos se sellaron y se tamizaron por 5 min a 460 rpm. Al finalizar el tamizado, se puso el polvo de conidios de cada repetición en sobres de papel aluminio previamente pesados. Se pesó la cantidad de polvo sobre el aluminio.

A partir del polvo de conidios obtenido en cada repetición, se procedió a determinar su viabilidad. Para esto se utilizó el mismo procedimiento de diluciones seriadas decimales empleada en etapas anteriores, con la modificación de introducirse 10 mg de polvo en un tubo de ensayo con 10 ml de agua destilada + Tween 80 0,05%. Se homogenizó bien la solución madre y se cuantificó el número de conidios/ml. A partir de esta suspensión inicial se fueron pasando alícuotas de 1 ml entre los tubos de ensayo de 9 ml con agua destilada + Tween 80 0,05% hasta llegar al orden de 10². Las diluciones seleccionadas se cultivaron por duplicado adicionando 0,1 µl en cajas de Petri con MC + cloranfenicol 0,5g/l. Esta etapa se hizo bajo condiciones estériles en la cámara de flujo laminar. Los resultados se observaron y anotaron a los tres días de incubación.

Los parámetros en evaluación en esta etapa consistieron en determinar: UFC/g de polvo y g conidios/kg de arroz.

Análisis Estadístico

Para corregir el porcentaje de mortalidad en la etapa del *screening* de cepas se utilizó la fórmula de Abbott. La CL_{90} se calculó por medio del análisis estadístico de Probit (G.A. Milliken, Universidad del Estado de Kansas). Para determinar la Sobrevivencia Media (SM) se empleó el programa Statistica (1999, Kernel release 5.5).

El Análisis de Varianza (ANOVA) en la etapa de compatibilidad con insecticidas se realizó por medio del programa Infostat (2001) Versión 1.0. La comparación entre las medias se hizo por medio del método Di Rienzo-Guzmán-Casanoves (DGC).

RESULTADOS

Selección de cepas

En la Tabla 3, se presentan los porcentajes de mortalidad obtenidos con 7 cepas evaluadas a una concentración de 5×10^9 conidios/m².

Tabla 3. Porcentajes de mortalidad de adultos de *Ceratitis capitata* obtenidos en la selección de cepas.

Cepa	Origen de la cepa	Porcentaje de mortalidad ^a
Bb 26	<i>Diatraea saccharalis</i> (Lep: Pyralidae)	97,3
Bb 259	Suelo	92,9
Bb 132	<i>Deuterocampta quadrijuga</i> (Col: Crisomelidae)	86,3
Bb 238	Suelo	82,7
Bb 2	<i>Diatraea saccharalis</i> (Lep: Pyralidae)	80,3
Bb 61	<i>Nezara viridula</i> (Hem: Pentatomidae)	78,1
Bb 65	<i>Nezara viridula</i> (Hem: Pentatomidae)	14

^a Corregido con la fórmula de Abbott

Concentración Letal 90 (CL₉₀) y Sobrevivencia Media (SM)

En la Tabla 4, se resumen los datos de CL₉₀ luego de realizar la prueba estadística de Probit y los resultados de SM obtenidos a partir de la concentración de 5×10^9 conidios/m² en las cuatro cepas seleccionadas.

Tabla 4. Concentración Letal 90 (CL₉₀) y Supervivencia Media (SM) de las cepas Bb 132, Bb 259, Bb 238 y Bb 26 en adultos de *Ceratitis capitata*.

Cepa	CL ₉₀ ^a 10 ¹¹ CV ^b /m ²	X ² (2 gl)	SM (días)
Bb 26	3,8 [9,2-1,2]	2,87	12
Bb 259	0,032 [0,02-0,07]	0,46	9
Bb 132	0,12 [0,073-0,24]	2,17	10
Bb 238	0,011 [0,0066-0,019]	3,16	7

^a Límites de confianza del 95%. ^b Conidios Viabiles.

Ensayos de compatibilidad con insecticida

Tabla 5. Cantidad de UFC/ml en 4 cepas de *B. bassiana* a diferentes concentraciones de insecticida (organofosforados).

Cepa	Mercaptotion		Dimetoato
	Concentración ¹	UFC/ml	UFC/ml
Bb 26	T	6,54 x 10 ⁴ a	1,28 x 10 ⁵ a
	50	8,65 x 10 ⁴ a	3,63 x 10 ⁴ b
	100	6,94 x 10 ⁴ a	0
	200	8,34 x 10 ⁴ a	0
Bb 259	T	2,55 x 10 ⁵ a	1,15 x 10 ⁵ a
	50	2,28 x 10 ⁵ a	2,78 x 10 ² b
	100	2,20 x 10 ⁵ a	0
	200	2,15 x 10 ⁵ a	0
Bb132	T	2,01 x 10 ⁵ a	1,52 x 10 ⁵ a
	50	2,13 x 10 ⁵ a	1,69 x 10 ⁵ a
	100	2,07 x 10 ⁵ a	6,08 x 10 ² b
	200	2,04 x 10 ⁵ a	0
Bb 238	T	1,17 x 10 ⁵ a	1,46 x 10 ⁵ a
	50	1,84 x 10 ⁵ b	7,23 x 10 ⁴ b
	100	1,80 x 10 ⁵ b	0
	200	1,37 x 10 ⁵ a	0

Letras distintas indican diferencias significativas por Di Rienzo-Guzmán-Casanoves (DGC) ($P < 0.01$). ¹ Dosis recomendada por el fabricante para la aplicación en campo = 4ml/l (Mercaptotion) y 110 ml/hl (Dimetoato).

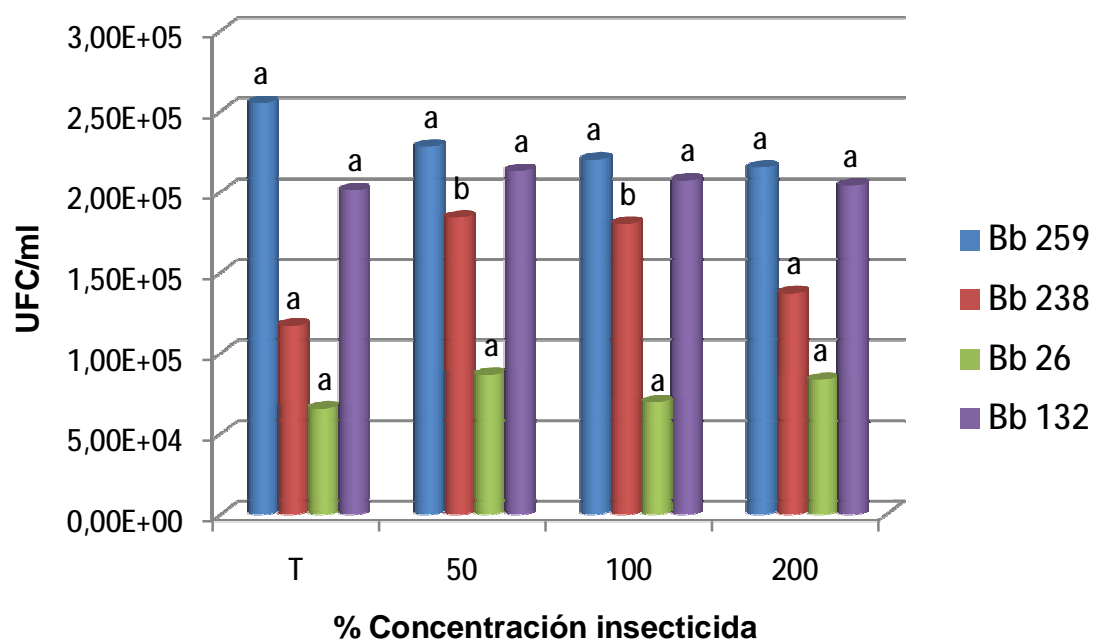


Figura 7. Compatibilidad de las cepas seleccionadas a diferentes concentraciones del insecticida Mercaptoton.

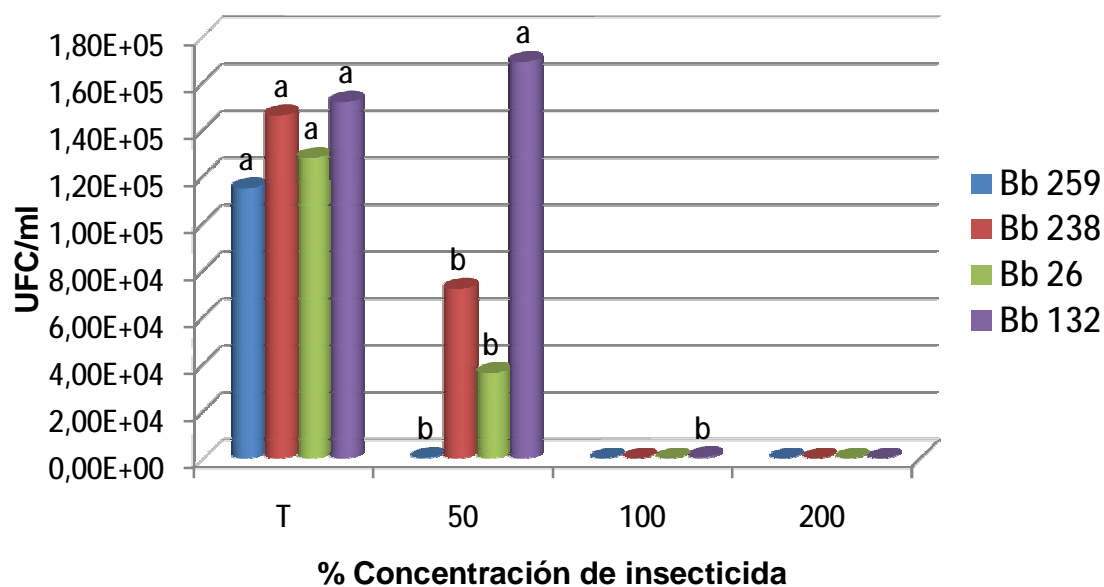


Figura 8. Compatibilidad de las cepas seleccionadas a diferentes concentraciones del insecticida Dimetoato.

Determinación de la producción de cepas seleccionadas

En la Tabla 6 se muestran los resultados promediados de UFC/g de conidios y g de conidios/kg de arroz obtenidos tras realizar los ensayos de producción en las cepas seleccionadas.

Tabla 6. Datos asociados a la producción en bolsas de arroz de las cepas seleccionadas.

Cepa	UFC/g de polvo	g conidios/ kg arroz
Bb 26	$6,97 \times 10^9$	20,67
Bb 132	$3,99 \times 10^9$	6,20
Bb 238	$9,37 \times 10^8$	19,78

DISCUSIÓN

Para lograr una selección de cepas es necesario contar con una metodología que permita agrupar cepas potencialmente útiles sobre los individuos que se estén evaluando. Naturalmente, si una cepa bajo condiciones de laboratorio no ocasiona una mortalidad alta a concentraciones elevadas de inóculo, esta no será considerada para posteriores pruebas. En este *screening* se utilizó una concentración de 5×10^9 conidios viables/m² tomando como base la concentración aplicada en campo de 5×10^8 conidios/m² ($= 5 \times 10^{12}$ conidios/ha) (Lecuona, 1996; Jenkins, *et al*, 1998). Esto permitió seleccionar 6 cepas (aisladas de diferentes regiones de Argentina) con porcentajes de mortalidad sobre adultos de MM superiores al 75% (Tabla 3). En orden decreciente de porcentaje de mortalidad, las cepas Bb 26, Bb 259, Bb 132 y Bb 238 fueron elegidas para determinarles posteriores parámetros en el laboratorio.

La cepa Bb 238 presenta el valor de CL₉₀ más bajo y la menor SM, lo cual la hace la cepa más virulenta y que requiere de menos cantidad de CV/m² para matar el 90% de las MM (Tabla 4). Si bien no es la cepa que presenta la mejor producción en términos de CV/g de polvo, esta es buena, al igual que su alta producción de gramos de conidios/kg de arroz (Tabla 6). En términos de CL₉₀, la Bb 259 presenta similar comportamiento con la cepa Bb 238 ya que las cantidades de CV para causar la mortalidad del 90% de insectos se encuentran dentro del mismo orden (10^9 CV/m²), no obstante, se requiere de dos días más para eliminar el 50% de las MM. La producción de Bb 259 no pudo llevarse a cabo debido a la alta humedad que afectó el desarrollo de esta cepa durante su incubación.

La cepa Bb 132 se puede considerar una cepa intermedia debido a que presenta una SM muy cercana a la de Bb 238, pero con una CL₉₀ en el orden de 10^{10} lo que la hace la segunda cepa menos efectiva en este rubro. Aún cuando esta cepa presenta muy baja producción de gramos de conidios/kg de arroz, sus CV la hacen la segunda mejor cepa en ese aspecto. Además, es importante aclarar que

habría que observar el comportamiento de la cepa tras varios ciclos de producción en el laboratorio y su comportamiento a gran escala.

La cepa Bb 26 posee el CL₉₀ y la SM más altas, aún cuando presenta los valores más altos en los dos parámetros de producción. Esta situación coloca a esta cepa dentro de la última opción de elección, ya que aún cuando da buenos resultados en producción es la cepa que eventualmente necesitaría más CV/m² para matar el 90% de las MM y que requiere de 12 días para eliminar el 50% de las MM.

Si bien no hay un valor definido de producción, existen valores reportados que pueden ser útiles. Esto ocurre debido a que cada sistema de producción puede presentar diferentes condiciones (temperatura, humedad, infraestructura, técnicas, entre otras) que pueden variar los rendimientos. Las cepas seleccionadas están próximas al valor de $4-5 \times 10^{10}$ conidios/g de polvo (Jenkins, *et al*, 1998) que resulta positivo en términos generales. Sin embargo, los rendimientos en la producción no son constantes e inclusive se han reportado variaciones en rendimientos dentro de sistemas de producción que presentan controles estrictos sobre variables como temperatura, humedad y aireación (Jenkins, *et al*, 1998).

Existe gran cantidad de sustratos empleados para la producción de hongos en el control biológico. Algunos de ellos son los sustratos a base de avena, mijo, sorgo, soja, frijoles, papa, trigo, maíz, cebada, pan, cubierta del maní y arroz (Lecuona, 1996; Jenkins, *et al*, 1998; Leite, *et al*, 2003). El empleo de matrices de arroz es uno de los sustratos más utilizados para la producción de hifomicetes, principalmente en países en vía de desarrollo (Leite, *et al*, 2003). En este caso, el empleo de arroz como sustrato obedece a varios factores, entre ellos: Fácil disponibilidad, bajo costo, balance nutricional, apropiada relación superficie/volumen que favorece una mayor esporulación e integridad estructural del arroz después del proceso de hidratación, esterilización y pos-colonización del hongo. Un sustrato que se destruya, limitará el espacio para la esporulación del hongo (Jenkins, *et al* 1998).

Como parte del desarrollo efectivo de un MIP, donde se empleen los HE como una estrategia dentro del control biológico, se debe tener claro el efecto de los insecticidas sobre los HE que se vayan a emplear, de manera que se cuente con la posibilidad de trabajarlos en conjunto dentro del sistema (Cuthbertson, *et al*, 2005).

Las cepas Bb 26, Bb 259 y Bb 132 no muestran diferencias significativas ($P < 0.01$) en cualquiera de las tres concentraciones de Mercaptotion utilizadas, con respecto al testigo (Ver tabla 5). En el caso de la cepa Bb 238, las concentraciones al 50% y 100% presentan diferencias significativas con respecto al testigo, no así la del 200% (Ver tabla 5). Este comportamiento se debe probablemente a algún componente tensioactivo presente en el formulado del insecticida (Ver anexo 1), causante de un mayor desprendimiento de conidios, resultando en un aumento en el número de UFC/ml, sin que la molécula activa del insecticida ni componentes del mismo formulado ocasionaran algún efecto negativo sobre esta cepa. En el caso de la concentración al 200%, la disminución en el número de UFC/ml, con respecto al 50% y 100%, pero no con el testigo, pudo ocurrir debido a que a pesar de una mayor cantidad de agente tensioactivo, también el aumento de principio activo y otros compuestos del formulado causaron un efecto negativo sobre la viabilidad de los conidios. De manera general, todas las cepas evaluadas son compatibles con el Insecticida Mercaptotion 100% CE (Lupara®).

Con respecto al insecticida Dimetoato, las cepas Bb 26, Bb 259 y Bb 238 presentan diferencias significativas ($P < 0.01$) entre la concentración al 50% y el testigo. Al 50% se pueden observar diferentes valores de UFC/ml entre estas tres cepas; lo que permite ordenarlas según su tolerancia o compatibilidad al Dimetoato: La Bb 238 es la que presenta mayor compatibilidad, seguido por la Bb 26 y por último, la Bb 259 (Ver tabla 5). Además, tanto al 100% como al 200% no hubo crecimiento de conidios por lo que el insecticida causó un 100% de

mortalidad en estas condiciones. Esto supone una baja compatibilidad de estas cepas con la concentración recomendada por el fabricante y el doble de ésta. Al 50% es recomendable no emplear ninguna de estas cepas.

La Bb 132, la más tolerante de todas las cepas en presencia del Dimetoato, no presenta diferencias significativas entre el 50% y el testigo, pero si al 100%. Esta cepa, a pesar de presentar conidios viables al 100%, no se considera compatible a esta condición debido a su baja viabilidad, pero si para posteriores ensayos en que se empleen concentraciones al 50% de Dimetoato 40% CE (Sistémico Icona). Mochi, *et al.* (2006), establece que los plaguicidas pueden inhibir el crecimiento vegetativo, conidiogénesis, esporulación, causar mutaciones genéticas y afectar el desarrollo de los HE, resultando en una baja viabilidad de los conidios, entre otras cosas. Sin embargo, estas consecuencias pueden variar según la naturaleza y concentración del producto químico, de la especie del hongo y su genética.

Si bien existen varios fabricantes de un mismo producto químico con igual principio activo, cada uno puede presentar diferentes comportamientos al evaluarse su compatibilidad con un HE, principalmente por los componentes del formulado. Así, Tamai, *et al.* (2002), obtuvo resultados en los que diferentes marcas comerciales del insecticida (a base de Dimetoato), en presentación de concentrado emulsionable (CE), eran muy tóxicos o compatibles con *B.bassiana*. Lo anterior sugiere que los resultados obtenidos en este trabajo con estos dos insecticidas, pueden variar al evaluarse otras marcas comerciales que presenten el mismo principio activo. Por tanto, conviene evaluar cada caso en particular.

CONCLUSIONES

El procedimiento utilizado bajo condiciones de laboratorio para inocular adultos de la MM con el entomopatógeno, permitió seleccionar las mejores cepas, así como determinar los parámetros de CL_{90} y SM.

El insecticida Mercaptotion 100% CE (Lupara®) presenta mejor comportamiento, a cualquiera de las concentraciones utilizadas, que el Dimetoato 40% CE (Sistémico Icona). Esto significa que este agroquímico puede ser empleado en forma conjunta con las cepas seleccionadas sin que exista riesgo de incompatibilidad con el entomopatógeno.

En caso de necesidad de emplear Dimetoato, se debería emplear la cepa Bb 132 ya que es la que presenta compatibilidad con este insecticida, pero a la mitad de la dosis recomendada por el fabricante. Las restantes cepas no son compatibles con este insecticida.

El rendimiento de la producción masiva puede ser mejorado trabajando con las condiciones o requerimientos de cada cepa. Por lo cual, la *performance* de las mismas podría ser aumentada durante el proceso de producción industrial.

Para una primera etapa de ensayos en condiciones naturales, se debería comenzar a ensayar con las cepas Bb 238, 259 o 132, ya que serían las más promisorias para el desarrollo de micoinsecticidas.

RECOMENDACIONES

La utilización de un cosechador de conidios sería importante para coleccionar el polvo de conidios después del proceso de producción, de manera que se eviten pérdidas en esta etapa final al realizar este procedimiento manualmente.

Es conveniente realizar ensayos en invernadero con las cepas seleccionadas para confirmar los resultados de laboratorio y ajustar dosis de aplicación antes de hacer ensayos experimentales en el campo.

En las cepas Bb 259, Bb 132 y en especial en la Bb 238 conviene realizar estudios más exhaustivos en los que se optimicen las condiciones (temperatura, humedad, aireación) para alcanzar altos niveles en la producción de conidios viables. De igual manera, con la cepa Bb 259 conviene trabajar bajo condiciones de humedad más bajas durante el periodo de incubación.

BIBLIOGRAFIA

ALTIERI, M. 1995. Control biológico en agroecosistemas mediante el manejo de insectos entomófagos. http://www.agroeco.org/doc/chap7_control_biologico1.htm.
Revisado: 13/6/07

ALVES, B. 1998. Controle microbiano de insetos. Editor: Sergio Batista Alves. Segunda edición. Piracicaba, Sao Paulo, Brasil. 1163 p.

ANGEL-SAHAGÚN, C.A., LEZAMA-GUITÉRREZ, R., MOLINA-OCHOA, J., GALINDO-VELASCO, E., LÓPEZ-EDWARDS, M., REBOLLEDO-DOMÍNGUEZ, O., CRUZ-VÁZQUEZ, C., REYES-VELÁZQUEZ, W.P., SKODA, S.R., FOSTER, J.E. Suceptibility of biological stages of the horn fly, *Haematobia irritans* to entomopathogenic fungi (Hyphomycetes). Journal of Insect Science, 5(50): 1-8 p.

ATHANASSIOU, C.G., STEENBERG, T. 2006. Insecticidal effect of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Ascomycota: Hypocreales) in combination with three diatomaceous earth formulations against *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). Biological Control, 40: 411-416 p.

BAHIENSE, T.C., FERNÁNDES, É.K.K., BITTENCOURT, V.R.E.P. Isolamento de uma cepa de *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphmycetes) e patogenicidade sobre larvas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). VIII Siconbiol – Simposio de Control Biológico, realizado entre 22-26 de junio del 2003. São Pedro. Publicado en Anais, 67 p.

BARRETO, R., MARQUES, E., GONDIM, M.G., VARGAS DE OLIVEIRA, J. 2004. Selection of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. for the control of the mite *Mononychellus tanajoa* (Bondar). Sci. Agric. (Piracicaba, Brazil), 61(6): 659-664 p.

BASSO, A. *Ceratitis* y *Anastrepha*: Posibilidades de manejo. X Congreso Nacional de Hortifruticultura. Mayo, 2005. Montevideo, Uruguay.

BEITIA, F., FALCÓ, J., PÉREZ-HINAREJOS, M., SANTIAGO, S., CASTAÑEDA, S. 2003. Importación de parasitoides exóticos para el control biológico de *Ceratitis capitata* en la comunidad Valenciana. Disponible en: <<<http://www.agricultura.gva.es/sdt/pdf/revista/citricos/24tema02.pdf>. >> Revisado: 13/7/07

BOSCAN, N. 1993. Manejo Integrado de Moscas de la Fruta. II Métodos de control. FONAIAP Divulga, N° 42. <<<http://www.ceniap.gov.ve/pbd/RevistasTecnicas/FonaiapDivulga/fd42/texto/moscas.htm>>> Revisado: 15/10/07

BROUGHTON, S.; DE LIMA, F., WOODS, B., HOFFMAN, H. 2006. Control of Mediterranean Fruit Fly (Medfly) in Backyards. <<http://www.agric.wa.gov.au/content/pw/ins/pp/hort/gn2004_024.pdf>> Revisado: 1/8/07

CASTILLO, M., MOYA, P., HERNÁNDEZ, E., PRIMO-YÚFERA, E. 2000 Susceptibility of *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) to entomopathogenic fungi and their extracts. Biological Control, 19: 274-282 p.

CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, PESCA Y ALIMENTACIÓN- GOBIERNO DE CANARIAS. 2005. Boletín Fitosanitario. <<<http://www.gobiernodecanarias.org/agricultura/agricultura/boletines/pdf/boletin03-2005.pdf>>> Revisado: 13/6/07

CORVALÁN, L. 2004. Evaluación del índice 0,01 capturas/trampa/día como indicador de baja prevalencia de *Ceratitis capitata* (Wiedemann) en duraznos importados. <<http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-

28072004000100010&lng=es&nrm=iso>> Agricultura Técnica, 64(1): 82-88 p.
Revisado: 15/5/07

CUTHBERTSON, A., WALTERS, K., DEPPE, C. 2005. Compatibility of the entomopathogenic fungus *Lecanicillium muscarium* and insecticides for eradication of sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*. Mycopathologia, 160: 35-41 p.

DAVIDSON, G., CHANDLER, D. 2005. Laboratory evaluations of entomopathogenic fungi against larvae and adults of onion maggot (Diptera: Anthomyiidae). Journal of Economic Entomology, 98(6): 1848-1855 p.

DEKKER, L., MESSING, R. 2006. Introduction to Managing Fruit Flies in Hawaii. Hawaii Diversified Technologies, Inc. y el Departamento de Entomología, Universidad de Hawaii
<<http://www.extento.hawaii.edu/Kbase/reports/fruit_pest.htm>> Revisado: 1/8/07

DE HOOG, G. S. 1972. The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium*, and *Acrodontium* gen. nov. Studies in Mycoogy, 1: 1-41 p.

DE LA ROSA, W., LÓPEZ, F. L., LIEDO, P. 2002. *Beauveria bassiana* as a pathogen of the Mexican Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) under laboratory conditions. Journal of Economic Entomology, 95(1): 36-43 p.

EKESI, S., MANIANIA, N. K., LUX, S. A. 2003. Effect of soil temperature and moisture on survival and infectivity of *Metarhizium anisopliae* to four tephritid fruit fly puparia. Journal of Invertebrate Pathology, 83: 157-167 p.

EKESI, S., MANIANIA, N. K., MOHAMED, S., LUX, S.A. 2005. Effect of soil application of different formulations of *Metarhizium anisopliae* on African tephritid fruit flies and their associated endoparasitoids. Biological Control, 35: 83-91 p.

FARIA, M., WRAIGHT, S. 2007. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43: 237-256 p.

FAVRET, E., LIFSCHITZ, E., MANSO, F. 1995. Esterilización de líneas autosexantes en la plaga de los frutales *Ceratitis capitata* Wied. (mosca del Mediterráneo). *Mendeliana*, 11 (2): 69-83 p.

FERRON, P. 1981. Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium*. En: *Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980*. Editado por H.D. Burges. Editorial Academic Press, New York. 465-482 p.

FUGUET, R., THÉRAUD, M., VEY, A. 2004. Production in vitro of toxic macromolecules by strains of *Beauveria bassiana*, and purification of a chitosanase-like protein secreted by a melanizing isolate. *Comparative Biochemistry and Physiology, Parte C* 138: 149-161 p.

GAZIT, Y., RÖSSLER, Y. 1999. Final report of the co-ordinated research programme on medfly female attractants. En: *Development of female medfly attractant systems for trapping and sterility assessment*. OIEA, Vienna, Austria. 67-72 p.

GONZÁLEZ, E. 2003. Efecto de la temperatura, humedad relativa y humedad del suelo sobre la patogenicidad de *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) en larvas de *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). Tesis Doctoral, Tecomán Colima, México. Universidad de Colima. 149 p.

HERRERA, J. R. 2005. Evaluación de la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de dos especies de mosca de la fruta (*Ceratitis capitata* y *Anastrepha obliqua*) bajo condiciones de laboratorio. Tesis Bachillerato, Cartago, Costa Rica. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 90 p.

HUMBER, R. 1998. Entomopathogenic Fungal Identification. Las Vegas, Nevadas, USA. Actualizado: Noviembre, 2005.

INDEX FUNGORUM. 2007. <<<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>>> Revisado: 26/6/07

INFOAGRO. 2002. Mosca de la fruta (*Ceratitis capitata* Wied.). <<http://www.infoagro.com/frutas/mosca_de_la_fruta.htm>> Revisado: 29/5/2007

JANG, E. *Ceratitis capitata*. 2006. Invasive Species Specialist Group (ISSG). <<<http://www.issg.org/database/species/ecology.asp?si=521&fr=1>>> Revisado: 1/8/07

JENKINS, N.E., HEVIEFO, G. LANGEWALD, J., CHERRY, A.J., LOMER, C.J. 1998. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. Biocontrol News and Information, 19(1): 21.31 p.

KONSTANTOPOULOU, M.A., MAZOMENOS, B.E. 2003. Evaluation of *Beauveria bassiana* y *B. brongniartii* strains and four wild-type fungal species against adults of *Bactrocera oleae* and *Ceratitis capitata*. BioControl, 50: 293-305 p.

LANZAVECCHIA, S. 2004. *Ceratitis capitata*: Pest Typification in Argentina. Tesis Doctoral, Buenos Aires, Argentina. Universidad de Buenos Aires. 127 p.

LECUONA, R. 1996. Microorganismos Patógenos Empleados en el Control Microbiano de Insectos Plaga. Editor: Roberto E. Lecuona. Buenos Aires, Argentina. 338 p.

LECUONA, R., EDELSTEIN, J.D., BERRETA, M., LA ROSSA, F.R., ARCAS, J. 2001. Evaluation of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) strains as potential

agents for control of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). Journal of Medical Entomology, 38 (2): 172-179 p.

LECUONA, R., TURICA, M., TAROCCO, F. CRESPO, D. 2005. Microbial control of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) with selected strains of *Beauveria bassiana*. Journal of Medical Entomology, 42(3): 332-336 p.

LEITE, L., BATISTA, A., ALMEIDA, J.E., ALVES, S. 2003. Produção de fungos entomopatogênicos. Editorial: Alexandre de Sene Pinto, 2003. Ribeirão Preto, Brasil. 92 p.

LELAND, J.E., MCGUIRE, M.R. 2006. Effects of different *Beauveria bassiana* isolates on Weld populations of *Lygus lineolaris* in pigweed (*Amaranthus* spp.). Biological Control, 39: 272-281 p.

LÓPEZ, M., SIVINSKI, J., RENDÓN, P., HOLLER, T., BLOEM, K., COPELAND, R., TROSTLE, M., ALUJA, M. 2003. Colonization of *Fopius ceratitivorus*, a newly discovered african egg-pupal parasitoid (Hymenoptera: Braconidae) of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). Florida. Entomol., 86(1): 53-60 p.

MANSO, F., CLADERA, J., FAVRET, E., LIFSCHITZ, E. 1990. Control genético de plagas. Publicación interna Instituto de Genética INTA Castelar. 11p

MAU, R.; MARTIN, J. *Ceratitis capitata* (Wiedemann). 2007. Departamento de Entomología, Universidad de Hawaii. Disponible en: <<<http://www.extento.hawaii.edu/Kbase/crop/Type/ceratiti.htm>>> Revisado: 1/8/07

MIRANDA, M.A., ALONSO, R., ALEMANY, A. 2001. Field Evaluation of Medfly (Dipt., Tephritidae) female attractants in a Mediterranean agrosystem (Balearic Islands, Spain). Journal of Applied Entomology, 125: 333-339 p.

MEYLING, N.V., EILENBERG, J. 2007. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biological Control*, 43: 145-155 p.

MOCHI, D.A., MONTEIRO, A.C., DE BORTOLI, S.A., DÓRIA, H., BARBOSA, J.C. 2006. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) in Soil with Different Pesticidas. *Neotropical Entomology*, 35 (3): 382-389 p.

MOHAMED, S., WHARTON, R., VON MÉREY, G., SCHULTHESS, F. 2006. Acceptance and suitability of different host stages of *Ceratitis capitata* (Wiedemann.) (Diptera: Tephritidae) and seven other tephritid fruit fly species to *Tetrastichus gifardii* Silvestri (Hymenoptera: Eulophidae). *Biological Control*, 39: 262-271 p.

NICOLETTI, R., DE STEFANO, S. 2000. Peptidi ciclici di origine fungina. *Revista Il Tabacco* 8: 33-59 p.

ORGANISMO INTERNACIONAL DE ENERGÍA ATÓMICA (OIEA). Aumento de la productividad en la agricultura. 2002. <<http://www.iaea.org/Publications/Factsheets/Spanish/agriculture_sp.pdf>>
Revisado: 16/7/07

ORGANISMO INTERNACIONAL DE ENERGÍA ATÓMICA (OIEA). 1999. Development of medfly attractants systems for trapping and sterility assessment. Insect and Pest Control Section. Vienna, Austria. 1-228 p.

PURCELL, M. F. 1998. Contribution of Biological Control to Integrated Pest Management of Tephritid Fruit Flies in the Tropics and Subtropics. *Integrated Pest Management Reviews*, Vol. 3, N° 2: 63-83 (21)

QUESADA-MORAGA, E., MARANHÃO, E.A.A., VALVERDE-GARCÍA, P., SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. 2005. Selection of *Beauveria bassiana* isolates for control of the whiteflies *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* on the basis of their virulence, thermal requirements, and toxicogenic activity. *Biological Control*, 36: 274-287 p.

QUESADA-MORAGA, E., RUIZ-GARCÍA, A., SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. 2006. Laboratory Evaluation of Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* Against Puparia and Adults of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*, 99(6): 1955-1966 p.

QUINTANILLA, R. 1946. *Zoología Agrícola*. Segunda edición. Editorial "El Ateneo". Impreso en Buenos Aires, Argentina. 757 p.

RENDÓN, P., SIVINSKI, J., HOLLER, T., BLOEM, K., LÓPEZ, M., MARTÍNEZ, A., ALUJA, M. 2006. The effects of sterile males and two braconid parasitoids, *Fopius arisanus* (Sonan) and *Diachasmimorpha krausii* (Fullaway) (Hymenoptera), on caged populations of Mediterranean fruit flies, *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) at various sites in Guatemala. *Biological Control*, 36: 224-231 p.

SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN (SAGARPA). 2007. Campaña Nacional contra Mosca de la fruta. <<http://senasicaw.senasica.sagarpa.gob.mx/portal/html/sanidad_vegetal/campanas_fitosanitarias/campana_nacional_contra_mosca_de_la_fruta.html>> Revisado: 8/3/07

SAGARPA. 2002. Ficha Técnica: *Ceratitis capitata* (Wiedmann). <<<http://web2.senasica.sagarpa.gob.mx/xportal/dgsv/dett/Doc438/Ficha%20Ceratitis%20capitata.doc>>> Revisado: 8/3/07

SAGARPA. 1995. Apéndice técnico para identificación de Moscas de la Fruta. <<http://web2.senasica.sagarpa.gob.mx/xportal/dgsv/cfito/Doc1333/APENDICE_TECNICO_PARA_IDENTIFICACION.pdf>> Última actualización: 2004. Revisado: 29/5/2007

SHAH, P.A., PELL, J.K. 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61: 413-423 p.

SUNG, G.H., HYWEL-JONES, N.L., SUNG, J.M, LUANGSA-ARD, BHUSHAN, S. SPATAFORA, J.W. 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology*, 59: 5-59 p.

TAFOYA, F., ZUÑIGA-DELGADILLO, M., ALATORRE, R., CIBRIAN-TOVAR, J., STANLEY, D. 2004. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* (Deuteromycota: Hyphomycetes) against the cactus weevil *Metamasius spinolae* (Coleoptera: Cuculionidae) under laboratory conditions. *Florida Entomologist*, 87(4): 533-536.

TAMAI, M.A., ALVES, S.B., LOPES, R.B., FAION, M., PADULLA, L.F.L. 2002. Toxicidade de produtos fitossanitários para *Beauveria bassiana* (Bals.) Viull. *Arquivos do Instituto Biologico (Arq. Inst. Biol.)* 69: 89-96 p.

THACKER, J.R.M. 2002. An introduction to arthropod pest control. Editor: J.R.M. Thacker. Cambridge University Press. Cambridge, Reino Unido. 343 p.

THOMAS, M.C., HEPPNER, J.B., WOODDRUFF, R.E., WEEMS, H.V., STECK, G.J., FASULO, T.R. 2005. Mediterranean Fruit Fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Insecta: Diptera: Tephritidae) Universidad de Florida. Estados Unidos. <http://edis.ifas.ufl.edu/IN371>. Revisado: Marzo, 2005

TOLEDO, J., LIEDO, P., FLORES, S., CAMPOS, S.E., MONTOYA, P. 2007. Potencial de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para el control de moscas de la fruta. V. Hernández-Ortiz (Ed.), Moscas

de la Fruta en Latinoamérica (Diptera: Tephritidae): Diversidad, biología y manejo. Sy G editores, México DF. 157-168 p.

UHLIG, S., IVANOVA, L. 2004. Determination of beauvericin and four other enniatins in grain by liquid chromatography–mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1050: 173-178 p.

WHARTONL, R.A., TROSTLEL, M.K., MESSING, R.H., COPELAND, R.S., KIMANI-NJOGU, S.W., LUX S., OVERHOLT, W.A., MOHAMED, S., SIVINSKI, J. 2000. Parasitoids of medfly, *Ceratitidis capitata*, and related tephritids in Kenyan coffee: a predominantly koinobiont assemblage. <<<http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/person/5208/PARASITOIDS%20OF%20MEDFLY.pdf>>> Revisado: 4/6/2007

ZUMBADO A., M. 2006. Dípteros de Costa Rica y la América Tropical. Editor: Manuel A. Zumbado, Santo Domingo de Heredia, Costa Rica: Instituto Nacional de Biodiversidad, INBio, 2006. 272 p

ANEXOS

Anexo 1.

Presencia de agentes tensioactivos en el insecticida Mercaptotion: Testigo, 50% y 200% (de izq. a der.)

